

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**BIANCA DE PAULA E RODRIGUES**

**ANÁLISE DO EFEITO DO SILDENAFIL SOBRE CÉLULAS-  
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM CAMUNDONGOS  
ATEROSCLERÓTICOS**

**Vitória**

**2017**

**BIANCA DE PAULA E RODRIGUES**

**ANÁLISE DO EFEITO DO SILDENAFIL SOBRE CÉLULAS-  
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM CAMUNDONGOS  
ATEROSCLERÓTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como  
requisito para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral  
Vasquez

**Vitória**

**2017**

**BIANCA DE PAULA E RODRIGUES**

**ANÁLISE DO EFEITO DO SILDENAFIL SOBRE CÉLULAS-  
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM CAMUNDONGOS  
ATEROSCLERÓTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 21 de dezembro de 2017.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha  
Examinador Interno - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gobbi Amorim  
Examinador Externo - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro  
Examinador Externo - UVV

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

## VITÓRIA

À minha mãe e à minha irmã que são as pessoas mais importantes da minha vida, e me ensinaram a definir metas e ser perseverante, sem dúvida foram essenciais para que esse sonho se tornasse possível. E ao meu filho Luís Felipe que ainda está no ventre, mas me deu novo ânimo de vida.

Essa vitória também é de vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus meu grande senhor e orientador, em Quem deposito toda a minha confiança.

À minha mãe, que me ensinou o valor do estudo e tanto se sacrificou para que eu pudesse chegar até aqui e ao meu pai (*in memoriam*), que sempre acreditou e investiu no meu futuro.

À minha irmã, amiga fiel, que sempre me apoiou, incentivou e lutou junto comigo para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus sobrinhos pelo amor e ao meu cunhado pela amizade indispensáveis. Aos meus familiares queridos pelo apoio e incentivo, em especial ao meu tio Luís Felipe pelo exemplo profissional que me estimulou a seguir essa carreira.

Ao meu marido Rafael, grande incentivador, que tem aguentado muitas ausências e compreendido a necessidade de me dedicar prioritariamente a esse objetivo/sonho. E que, com calma, aguardou a realização do nosso projeto de ter um filho que agora se realizou no tempo certo.

Ao meu filho Luís Felipe que ainda está sendo gerado, mas já é muito amado e me deu um novo sopro de esperança para continuar o meu sonho.

Aos amigos mais do que especiais que sempre caminharam comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez que concedeu a honra de me orientar nessa jornada, uma pessoa de conhecimento e generosidade imensuráveis e que me proporcionou uma experiência enriquecedora. Sou extremamente grata pela confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança, incentivo, apoio e sugestões.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro pela atenção e generosidade em me ensinar e pelo incentivo a prosseguir buscando sempre novos conhecimentos.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq, FAPES e FACITEC pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Translacional que se tornaram uma família maravilhosa para mim.

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

**GALILEU GALILEI**

## RESUMO

Um declínio na funcionalidade das células-tronco pode ser um componente chave na patogênese das doenças cardiovasculares. Na aterosclerose ocorre aumento de agentes genotóxicos endógenos, como espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos oxidativos ao DNA. Sabe-se que o sildenafil, inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5), apresenta efeito antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do tratamento crônico com sildenafil sobre os níveis de ROS, a sua influência em sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, sobre a genotoxicidade, cinética de reparo do DNA e apoptose em células-tronco hematopoiéticas (HSC) de camundongos ateroscleróticos apoE *knockout* (apoE<sup>-/-</sup>). Foram utilizados camundongos machos apoE<sup>-/-</sup> com 20 semanas de idade. Nas 3 últimas semanas, os animais foram divididos em dois grupos: tratados com veículo (apoE<sup>-/-</sup> veículo, n=25) ou sildenafil (Viagra®; 40 mg/Kg/dia; apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, n=25), por gavagem. Animais da linhagem C57BL/6 *wild-type* (C57 veículo, n=25) foram submetidos ao mesmo protocolo que os animais do grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado para análise do perfil lipídico e as HSC isoladas através de cultura celular. Os níveis de ROS, imunofenotipagem, vias pró-oxidantes, antioxidantes e apoptose foram avaliados por citometria de fluxo. As análises de genotoxicidade e cinética de reparo do DNA foram realizadas através do ensaio do cometa alcalino modificado. A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida de *post hoc* de Bonferroni, adotando o nível de significância de 5% (\*p<0,05 vs. C57 veículo; #p<0,05 vs. apoE<sup>-/-</sup> veículo; §p<0,05 vs. *background*). Foi possível observar um aumento nos níveis intracelulares de ROS nas HSC de animais apoE<sup>-/-</sup> veículo (1,3 vezes) quando comparados aos animais C57 veículo, e o tratamento com sildenafil diminuiu (22%) os níveis de ROS nos animais apoE<sup>-/-</sup>. Observou-se uma grande influência dos sistemas NADPH oxidase e xantina oxidase na produção de ROS nos animais ateroscleróticos, o tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir essa influência a níveis semelhantes ao controle. Assim como, a influência das enzimas antioxidantes superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase na redução dos níveis de ROS estavam menores nos



animais apoE<sup>-/-</sup> veículo quando comparados aos controle, e os animais tratados com sildenafil tiveram a influência dessas enzimas aumentada na redução dos níveis de ROS. Além disso, observou-se um aumento nos níveis de dano oxidativo ao DNA nas HSC dos animais apoE<sup>-/-</sup> veículo (4,0 vezes) quando comparados aos animais C57 veículo, sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de reverter completamente esse quadro. Bem como, uma diminuição na capacidade de reparo do DNA em HSC dos animais apoE<sup>-/-</sup> veículo foi observada quando comparados aos animais C57 veículo, sendo que o tratamento com sildenafil conseguiu aumentar essa capacidade para os níveis semelhantes aos dos animais controle. Os resultados mostraram um aumento em relação a número de HSC em apoptose nos animais apoE<sup>-/-</sup> veículo (7,0 vezes) quando comparados aos animais C57 veículo, sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de reverter completamente esse quadro. Nossos resultados sugerem que a aterosclerose aumenta a produção de ROS em HSC, aumentando a influência de sistemas pró-oxidantes e diminuindo a capacidade antioxidante. Assim, esse desequilíbrio no estresse oxidativo leva a um aumento da genotoxicidade, e, consequente sobrecarga no sistema de reparo do DNA. Assim, essa elevação nos níveis de fragmentação do DNA podem estar associados ao aumento da apoptose nessas células. Conquanto, o tratamento com o sildenafil foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e, consequentemente, diminuir o dano oxidativo e aumentar a capacidade de reparo do DNA, reduzindo os níveis de morte celular em HSC dos animais ateroscleróticos. Estes resultados são inéditos na literatura e devem contribuir de maneira relevante na busca de novas terapias de prevenção e tratamento da aterosclerose e suas consequências.

Palavras-chaves: Doença cardiovascular; aterosclerose; estresse oxidativo; genotoxicidade; terapia antioxidante.

## ABSTRACT

A decline in the functionality of stem cells may be a key component in the pathogenesis of cardiovascular diseases. In atherosclerosis, there is an increase in endogenous genotoxic agents, such as reactive oxygen species (ROS), which can cause oxidative damage in DNA. Considering previous report that sildenafil, an inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5), have antioxidant effects, in the present study we evaluated the effect of this drug on ROS levels, on pro-oxidant and antioxidant systems, on genotoxicity, on DNA repair kinetics and on apoptosis in hematopoietic stem cells (HSC) of atherosclerotic apoE knockout mice (apoE<sup>-/-</sup>). For this study were used male 20-week old apoE<sup>-/-</sup> mice. Animals were distributed into three different groups: apoE<sup>-/-</sup> mice administered with the PDE5 inhibitor sildenafil (apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, Viagra®, 40 mg/kg/day, for 3 weeks, by oral gavage, n=25), apoE<sup>-/-</sup> mice administered with vehicle (apoE<sup>-/-</sup> vehicle, n=25) and Wild-type C57Black/6 mice (C57 vehicle, n=25). Then, animals were euthanized, blood collected for analysis of the lipid profile. The HSC were isolated by cell culture for assessed of ROS production, DNA damage, DNA repair kinetics and apoptosis by flow cytometry. Statistical comparisons were done by ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test. Values of \*p<0.05 vs. C57 vehicle; #p<0.05 vs. apoE<sup>-/-</sup> vehicle and \$p <0.05 vs. background. ApoE<sup>-/-</sup> vehicle group HSC showed an increase in intracellular ROS levels (1.3-fold) compared with control animals and administration of sildenafil decreased these levels (22%). It was observed a higher influence of NADPH oxidase and xanthine oxidase systems on ROS production in atherosclerotic animals, treatment with sildenafil was able to decrease this influence at levels similar to control. As well as, the antioxidant enzymes influence such as superoxide desmutase, catalase and glutathione peroxidase on the reduction of ROS levels was lower in the apoE<sup>-/-</sup> vehicle animals when compared with controls and the treatment with sildenafil increased this enzymes influence in the reduction of ROS levels. Similarly, HSC from apoE<sup>-/-</sup> vehicle mice showed a 4-fold oxidative DNA fragmentation compared with C57 vehicle and sildenafil-administered apoE<sup>-/-</sup> mice exhibited minimal DNA damage in HSC similar to control mice. In addition, a decrease in HSC's DNA repair capacity was observed in apoE<sup>-/-</sup> vehicle animals when compared to C57 vehicle animals

and treatment with sildenafil was able to increase this ability at levels similar to controls animals. The results also showed an increase in the percentage of HSC in apoptosis in apoE<sup>-/-</sup> vehicle animals (7.0-fold) when compared to C57 vehicle animals and treatment with sildenafil was able to completely reverse this condition. Our data shows that atherosclerosis increases ROS production in HSC, apparently, increasing the pro-oxidant systems influence and decreasing antioxidant capacity. Thus, this imbalance in oxidative stress leads to an augment in genotoxicity, and, consequent, overload in the DNA repair system. The higher levels of DNA fragmentation can be associated with increased apoptosis in HSC. Interestingly, the treatment with sildenafil was able to reduce oxidative stress and, consequently, oxidative damage and DNA repair overload, reducing apoptosis levels in HSC of atherosclerotic animals. The novelty of this study is that sildenafil may offer a new perspective to the use of PDE5 inhibitors to protect against DNA damage, in cells involved in the organism plasticity in atherosclerosis.

**Keywords:** Cardiovascular disease, atherosclerosis, oxidative stress, oxidative DNA damage, antioxidant therapy.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Taxa de mortalidade por grupos de causas no Brasil .....	20
<b>Figura 2:</b> Aterogênese .....	24
<b>Figura 3:</b> Origem e classificação das células-tronco ao longo do desenvolvimento embrionário .....	25
<b>Figura 4:</b> Esquema hipotético ilustrando o papel de ROS e diminuição da biodisponibilidade de NO• na disfunção vascular em condições de hipercolesterolemia e aterosclerose .....	29
<b>Figura 5:</b> Visão simplificada da atuação de ROS no dano ao DNA na aterosclerose .....	30
<b>Figura 6:</b> Ação do inibidor da fosfodiesterase 5 (sildenafil) sobre o endotélio .....	33
<b>Figura 7:</b> Modelo murino para estudo da aterosclerose pela inativação do gene da apolipoproteína E (apoE <i>knockout</i> ) .....	36
<b>Figura 8:</b> Grupos experimentais e esquema de tratamento dos animais .....	38
<b>Figura 9:</b> Isolamento de células-tronco hematopoiéticas .....	39
<b>Figura 10:</b> Cultura celular .....	39
<b>Figura 11:</b> Medida do perfil lipídico .....	40
<b>Figura 12:</b> Contagem celular e análise de viabilidade em câmara de Neubauer .....	41
<b>Figura 13:</b> Congelamento da amostra .....	42
<b>Figura 14:</b> Citômetro de fluxo FACSCanto II e software FACSDiva ....	44
<b>Figura 15:</b> Primeira camada de agarose .....	47
<b>Figura 16:</b> Ensaio cometa .....	49
<b>Figura 17:</b> Tabela de resultados fornecida pelo CASP .....	50
<b>Figura 18 -</b> Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas de camundongos C57 .....	54
<b>Figura 19 –</b> Efeito da aterosclerose e do tratamento com sildenafil sobre o estresse oxidativo em células-tronco hematopoiéticas de camundongos .....	56
<b>Figura 20 –</b> Participação das vias pró-oxidantes xantina oxidase e NADPH oxidase na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil sobre essas vias em células-tronco hematopoiéticas de camundongos .....	57
<b>Figura 21 –</b> Avaliação da influência das vias antioxidantes na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil sobre essas vias em células-tronco hematopoiéticas de camundongos .....	58
<b>Figura 22 –</b> Avaliação da genotoxicidade na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil em células-tronco hematopoiéticas de	

camundongos .....	60
<b>Figura 23</b> – Avaliação da cinética de reparo do DNA após indução ao dano oxidativo com peróxido de hidrogênio em células-tronco hematopoiéticas de camundongos .....	61
<b>Figura 24</b> – Efeito da aterosclerose e do tratamento com sildenafil sobre a apoptose em células-tronco hematopoiéticas de camundongos .....	63
<b>Tabela 1:</b> Perfil lipídico plasmático .....	53
<b>Tabela 2:</b> Porcentagem média de HSC viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e necrose .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA: análise de variância
- apoE /apoE<sup>-/-</sup>: camundongo apoE *knockout*
- BD: Becton, Dickinson and Company
- BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina
- CAT: catalase
- CEUA-EMESCAM: Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
- C57BL/6: camundongos da linhagem C57 black/6

- CML: células musculares lisas
- CTA: células-tronco adultas
- CTE: células-tronco embrionárias
- DCV: doenças cardiovasculares
- DCF: diclorofluoresceína
- DCFH: diclorodihidrofluoresceína
- DHE: dihidroetídio
- DEMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
- Endo III: endonuclease III
- EPM: erro padrão da média
- FACS: separador celular ativado por fluorescência (fluorescence activated cell sorter)
- FITC: fluoresceína
- FPG: formamidopyrimidine\_DNA-glicosilaseFS: fosfatidilserina
- GC: guanilato ciclase
- GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
- GPx: glutathione peroxidase
- GTP: trifosfato de guanosina
- HDL: lipoproteínas de alta densidade
- H<sub>2</sub>DCFDA: diacetato de diclorodihidrofluoresceína
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio
- HONO<sub>2</sub>: ácido peroxinitroso
- HPF: hidroxifenil fluoresceína
- HSC: células-tronco hematopoiéticas
- IDL: lipoproteínas de densidade intermediária
- iNOS: óxido nítrico sintase induzível
- L-arg: L-arginina

- LDL: lipoproteína de baixa densidade
- LMP: *Low Melting Point Agarose*
- LOO•: radical peroxila
- LTCC: Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular
- MC: meio completo
- MIF: mediana da intensidade de fluorescência
- MO: medula óssea
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NMP: *Normal Melting Point Agarose*
- NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrogênio
- NO•: óxido nítrico
- O<sub>2</sub>: oxigênio molecular
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio *singlet*
- •O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido
- •OH: radical hidroxila
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito
- oxNADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
- oxLDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada
- PARP-1: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
- PBS: solução tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Saline*)
- PDE5: fosfodiesterase tipo 5
- PI: iodeto de propídio
- PK: proteínas quinase
- QM: quilomicrons
- ROS: espécies reativas de oxigênio
- SBF: soro fetal bovino
- SOD: superóxido dismutase
- SUS: Sistema Único de Saúde
- TPO: trombopoietina
- VCAM-1: moléculas de adesão celular-vascular-1
- VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade

- XO: xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	20
1.1.1 Epidemiologia.....	20
1.1.2 Doenças Cardiovasculares e Aterosclerose .....	21
1.1.3 Modelo Experimental <i>Knockout</i> para a Apolipoproteína E .....	21
1.1.4 Aterogênese .....	23
1.2 CÉLULAS-TRONCO .....	24
1.2.1 Células-tronco hematopoiéticas .....	26
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO .....	27



1.3.1 Estresse oxidativo e aterosclerose .....	27
1.3.2 Estresse oxidativo, aterosclerose e dano ao DNA .....	28
1.3.3 Estresse oxidativo, aterosclerose e apoptose .....	30
1.4 TERAPIA ANTIOXIDANTE .....	31
1.3.1 Monofosfato Cíclico de Guanosina e Fosfodiesterases .....	31
1.3.2 Inibidor da fosfodiesterase tipo 5 .....	32
 <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	 34
 <b>3 OBJETIVOS</b> .....	 35
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
 <b>4 METODOLOGIA</b> .....	 36
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	36
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
4.3 COLETA DE SANGUE E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO	37
HEMATOPOIÉTICAS .....	
4.4 MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO .....	40
4.5 QUANTIFICAÇÃO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO	40
HEMATOPIÉTICAS .....	
4.6 CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	41
4.7 ENRIQUECIMENTO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO	42
HEMATOPOIÉTICAS .....	
4.8 IMUNOFENOTIPAGEM .....	43
4.9 MEDIDA DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS	44
NÍVEIS CITOPASMÁTICOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	
4.10 AVALIAÇÃO DAS VIAS PRÓ-OXIDANTES .....	45
4.11 AVALIAÇÃO DAS VIAS ANTIOXIDANTES .....	46
4.12 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE .....	46
4.12.1 Preparo das lâminas .....	46
4.12.2 Lise, tratamento, desenovelamento e eletroforese .....	47
4.12.3 Coloração e análise .....	48
4.13 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPARO DO DNA .....	50
4.14 ANÁLISE VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR .....	50
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
 <b>5 RESULTADOS</b> .....	 53
5.1 PERFIL LIPÍDICO .....	53
5.2 IMUNOFENOTIPAGEM .....	53
5.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO	54

DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	
5.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS VIAS PRÓ-OXIDANTES .....	56
NADPH OXIDADASE E XANTINA OXIDASE .....	
5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS VIAS ANTIOXIDANTES .....	58
5.6 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE .....	59
5.7 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPARO DO DNA .....	60
5.8 ANÁLISE VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR .....	62
 <b>6 DISCUSSÃO .....</b>	 <b>64</b>
 <b>7 CONCLUSÃO .....</b>	 <b>73</b>
 <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 <b>74</b>
 <b>9 ANEXO .....</b>	 <b>87</b>

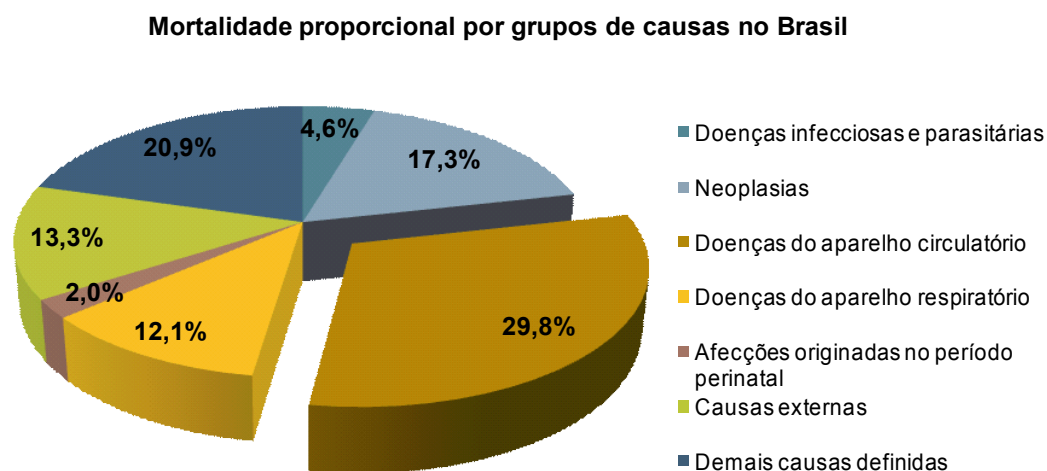
## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

#### **1.1.1 Epidemiologia**

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que as doenças cardiovasculares (DCV) *são a principal causa de morte em todo o mundo*: mais pessoas morrem anualmente de doenças cardiovasculares do que de qualquer outra causa. Estima-se que, em 2015, 17,7 milhões de pessoas morreram de DCV, representando 31% de todas as mortes no mundo, sendo que 7,4 milhões dessas mortes tiveram como causa doença cardíaca coronária e 6,7 milhões acidente vascular cerebral (1).

Mais de três quartos das mortes por DCV ocorrem em países de baixa e média renda, atingindo em sua maioria indivíduos com menos de 70 anos de idade. As DCV são responsáveis por 29,8% das mortes no Brasil, sendo também considerada a principal causa de morte no país (figura 1) (2). No Espírito Santo foram registrados 6.398 óbitos por DCV em 2013 (2). Esses dados estão associados a uma elevada taxa de internação, 56,3% das internações do Sistema Único de Saúde (SUS) são devido às DCV (2).



**Figura 1:** Taxa de mortalidade por grupos de causas no Brasil. Fonte: DATA-SUS, 2013 (2).

Os fatores de risco comportamentais mais importantes para o desenvolvimento de DCV são dieta inadequada, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo. Esses fatores de risco comportamentais podem desencadear hipertensão arterial, hiperglicemia, dislipidemia, sobrepeso e obesidade (3). E são esses "fatores de risco intermediários" que aumentam as chances de desenvolvimento de DCV e que ajudam a montar o panorama demonstrado anteriormente de mortalidade por DCV (4,5).

### 1.1.2 Doenças Cardiovasculares e Aterosclerose

As DCV afetam o coração e as artérias, sendo que a maioria está relacionada à presença da aterosclerose (3). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (6) que pode ser iniciada e/ou agravada pela hipercolesterolemia (7–9). Vários estudos demonstram que o desenvolvimento dessa doença é resultado de distúrbios metabólicos, estresse oxidativo e ação de mediadores pró-inflamatórios (9–11).

De acordo com a OMS, doenças metabólicas como obesidade, diabetes e dislipidemia têm se tornado verdadeiras epidemias mundiais, havendo, portanto uma tendência ao aumento nas mortes causadas por DCV (1). Assim sendo,

estudos sobre a patogênese e formas de tratamento da aterosclerose são extremamente importantes para reverter e/ou prevenir esse quadro.

### 1.1.3 Modelo Experimental *Knockout* para a Apolipoproteína E

Durante as últimas décadas, a compreensão dos mecanismos moleculares da aterogênese foi revolucionada por estudos em modelos animais, incluindo coelhos, porcos, primatas não humanos e roedores (4). O modelo murino para estudo da aterosclerose pela inativação do gene da apolipoproteína E (apoE – figura 2) por recombinação homóloga desenvolve lesões avançadas e é um dos modelos mais utilizados em estudos genéticos e fisiológicos (9).

O processo de transporte dos lipídeos do intestino para os hepatócitos e destes para os tecidos periféricos é dependente das apolipoproteínas, podendo na ausência destas haver um desequilíbrio impedindo a remoção das lipoproteínas-colesterol da circulação. Assim, qualquer mutação em uma apolipoproteína pode resultar em padrões lipoprotéicos anormais e contribuir para o aparecimento de doenças, como a aterosclerose (12,13).

Os lipídeos obtidos na dieta circulam sobre a forma de quilomicrons (QM) e aqueles sintetizados pelo fígado, sob a forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoproteins* - VLDL), sendo consideradas partículas ricas em triglicerídeos. Sob a ação da lipase lipoproteica no endotélio vascular, tais lipoproteínas liberam triglicerídeos para os tecidos e são transformadas, respectivamente, em remanescentes de QM e lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediate density lipoproteins* - IDL). Essas partículas remanescentes são internalizadas pelo fígado por meio da ligação ao receptor de LDL mediada pela apolipoproteína E (apoE). Os QM e as VLDL podem transferir parte de seu conteúdo de triglicerídeos para lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins* - HDL), em troca de ésteres de colesterol, sob ação da enzima de transferência de colesterol esterificado (CETP - *cholesteryl ester transfer protein*). Na microvasculatura hepática, o excesso de VLDL e IDL pode ser transformado em lipoproteínas de densidade

baixa (*low density lipoproteins* - LDL), que se ligam ao receptor celular de LDL, iniciando o processo de depuração e degradação desta partícula (14).

A ausência da apoE impede que as lipoproteínas VLDL e IDL se liguem aos receptores hepáticos e sejam retiradas da circulação (12,15). Dessa forma, observa-se um aumento nos níveis de VLDL no plasma e, conseqüentemente, de LDL. O camundongo apoE *knockout* (apoE<sup>-/-</sup>) apresenta níveis de colesterol plasmático 5-6 vezes maior que os camundongos controle da linhagem C57 black/6 (8,9,15,16).

Considerando que camundongos apoE<sup>-/-</sup> e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes responsáveis pelo controle do metabolismo de lipoproteínas, a utilização destes animais em estudos experimentais *in vivo* tem apresentado resultados importantes (12), contribuindo para o entendimento da aterogênese e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

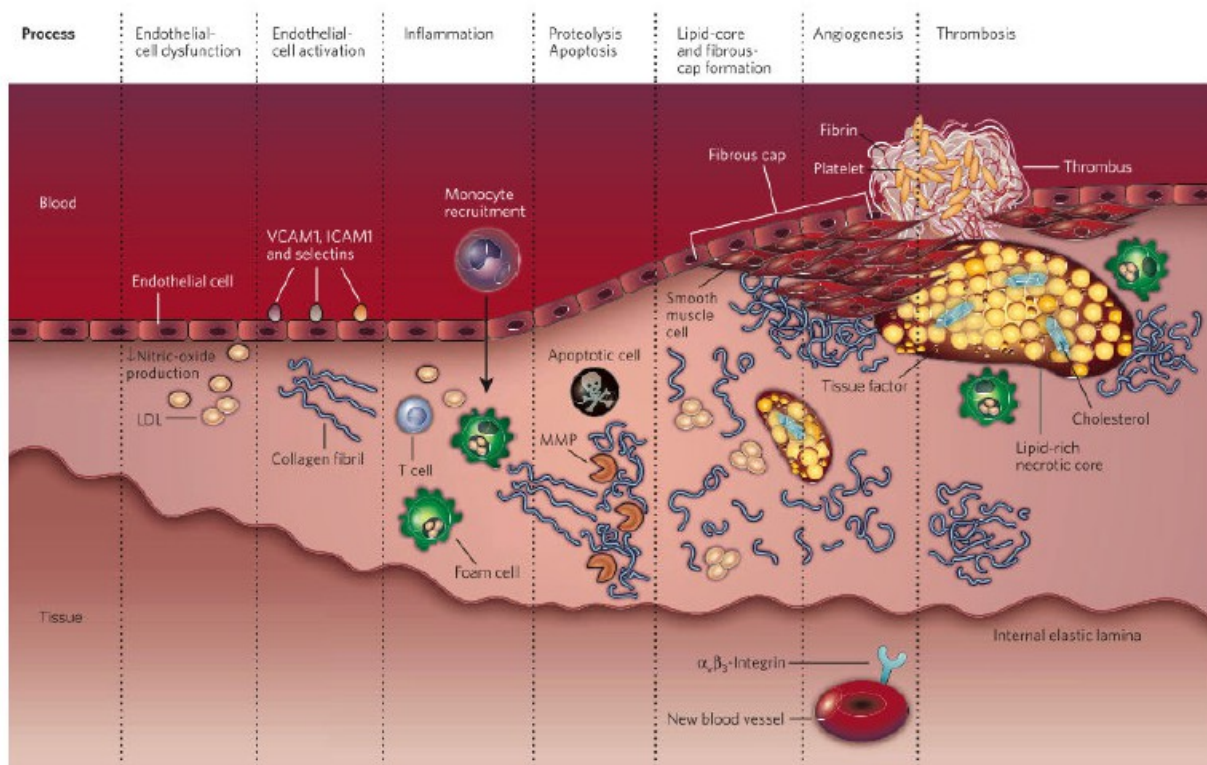
#### **1.1.4 Aterogênese**

Uma série definida de mudanças no vaso ocorre durante a aterogênese e células inflamatórias derivadas do sangue, particularmente monócitos/macrófagos, desempenham papel fundamental nesse processo (4).

O evento primário da aterogênese é o acúmulo de LDL na matriz subendotelial, e esse acúmulo é maior quando os níveis de LDL na circulação estão elevados (4,8,9). O LDL aprisionado sofre oxidação, provavelmente pela ativação do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (oxNADPH) dos macrófagos, e torna-se imunogênico, causando, assim, liberação de fatores inflamatórios (17,18). Além disso, ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, principalmente moléculas de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e selectinas-P, que resultam no recrutamento de mais leucócitos, principalmente os do tipo mononuclear (monócitos e linfócitos) que são atraídos para o local de formação da placa (17,18).

Na camada íntima das artérias os monócitos se diferenciam em macrófagos que possuem receptores especiais chamados *scavengers* (sequestradores) que fagocitam as moléculas de LDL oxidados (oxLDL) originando as chamadas células espumosas, que são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (6,17,18).

Com a evolução da placa aterosclerótica, os macrófagos e os linfócitos T são estimulados a secretar alguns mediadores da inflamação como, por exemplo, interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que aumentam o recrutamento de leucócitos para o local da placa (4,17). Ocorre, também, a secreção de fatores do crescimento, como por exemplo, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e de fibroblastos (FGF) que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas (CML) da camada média arterial para a íntima. Essas células passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica e a partir desse estágio a placa passa a ser considerada ateromatosa (figura 2) (6,17).



**Figura 2:** Aterogênese. Adaptado de Sanz e Fayad, 2008 (19).

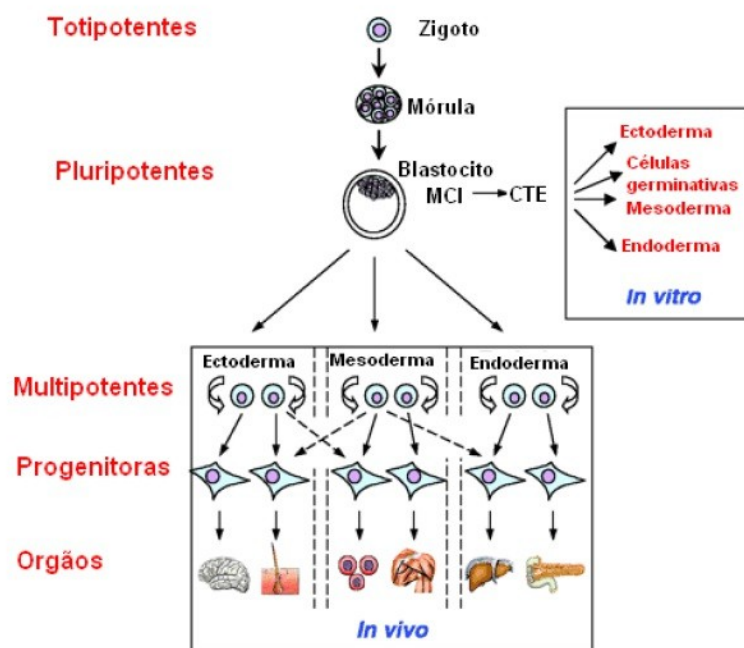
## 1.2 CÉLULAS-TRONCO

Considera-se como célula-tronco um tipo especial de célula que apresenta capacidade de se renovar e originar diferentes tipos celulares especializados, não possuindo nenhuma função específica até que essa receba um sinal do ambiente, direcionando-a a diferenciação em uma célula especializada (20). Esses sinais incluem danos aos tecidos como: trauma, fraturas, inflamação, necrose e tumores (20).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação em totipotentes (capazes de gerar todas as células do organismo, inclusive as da placenta), pluripotentes (capazes de gerar células dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma) e multipotentes (células capazes de se diferenciar em vários tipos celulares) (figura 3).



Conceitualmente, elas também podem ser classificadas de acordo com sua origem em dois tipos: células-tronco embrionárias (CTE), se isoladas da massa celular interna presente no blastocisto, e células-tronco adultas (CTA), se isoladas de outros tecidos (figura 3). Apesar do potencial de diferenciação das primeiras está bem caracterizado em camundongos e em humanos, seu uso em terapia celular e em pesquisa tem sido dificultado por questões de histocompatibilidade, segurança e ética. No entanto, as CTA não apresentam estes empecilhos, apesar da extensão de sua plasticidade ainda estar sob investigação (21).



**Figura 3:** Origem e classificação das células-tronco ao longo do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Wobus, *et al.* 2005 (22).

As CTA não são totipotentes como as CTE, elas são multipotentes, ou seja, possuem o potencial de diferenciação menor (23). As CTA mais conhecidas são aquelas presentes na medula óssea, essas células são capazes de se dividir em células progenitoras e posteriormente se diferenciar em células maduras especializadas. A medula óssea é derivada do mesoderma embrionário e é formada por uma população de células-tronco hematopoiéticas (HSC), suportadas por um estroma mesenquimal (24).

### 1.2.1 Células-tronco hematopoiéticas

As HSC são as únicas células do sistema hematopoiético que exibem extenso potencial proliferativo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema linfo-hematopoiético. Esta característica se mantém continuamente, até a morte (25). Assim, podem ser usadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético (21).

As HSC podem ser isoladas de diversas fontes como medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical (26,27). É uma população de células muito raras correspondendo a aproximadamente 0,001% a 0,5% do total de células da medula óssea, e está em ainda menor número no sangue periférico. As HSC são caracterizadas imunofenotipicamente pela presença dos marcadores de superfície específicos.

Em princípio, a função destas células é apoiar processos de renovação fisiológica, reconstituindo o sistema hematopoiético, assim sendo, podem se diferenciar em diversas linhagens de células do sangue, tanto da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, células dendríticas) quanto da linhagem linfóide (linfócitos T, linfócitos B, serial Killers) (28). Não obstante, estudos em modelos animais adequados são necessários para investigar a ação de doenças, como a aterosclerose, sob esse tipo celular.

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, predominando a ação danosa das espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre as células (29).

As ROS incluem os radicais livres, como o ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ), bem como espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ). As ROS são produzidas continuamente na cadeia

respiratória das mitocôndrias com a redução de um elétron do oxigênio molecular (30). A oxNADPH e xantina oxidase (XO) são grandes fontes enzimáticas de ROS em células de mamíferos (30).

### 1.3.1 Estresse oxidativo e aterosclerose

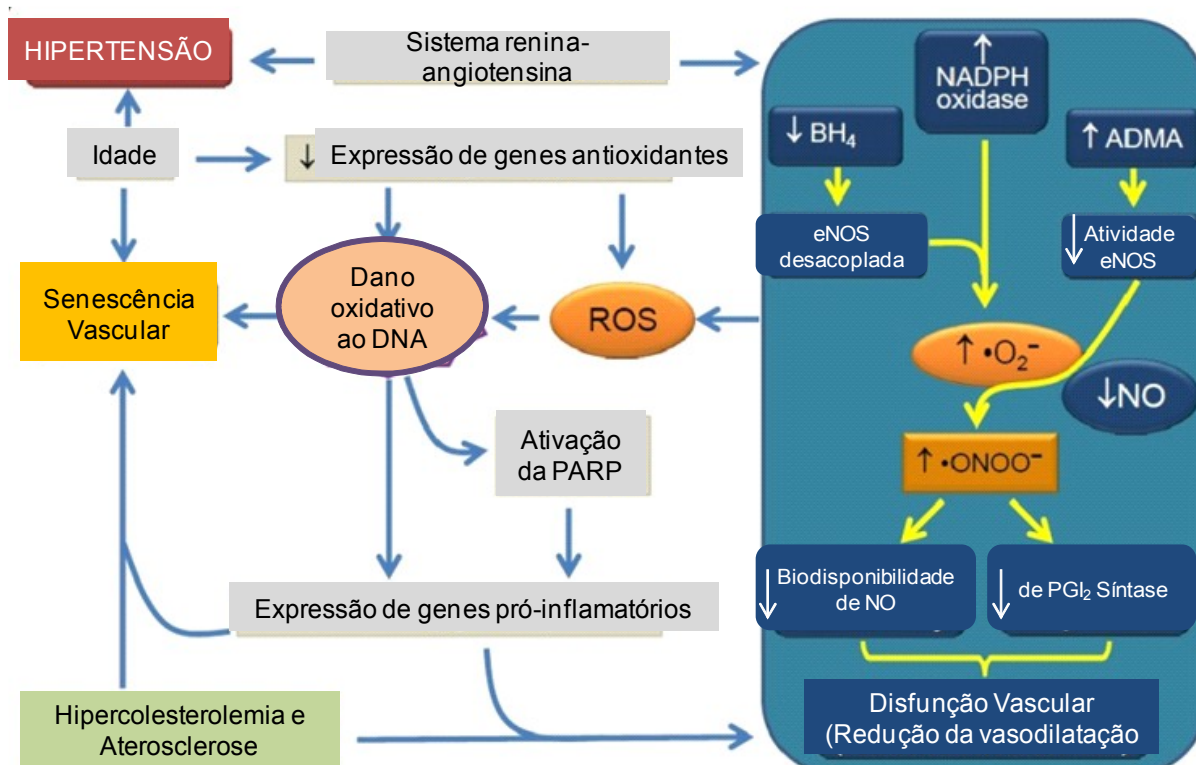
Um dos mecanismos mais estudados na doença aterosclerótica está relacionado com a peroxidação lipídica. De acordo com a hipótese de modificação oxidativa, a ativação das células inflamatórias durante a aterogênese resulta no aumento dos leucócitos no sangue, que liberam metabólitos do oxigênio, promovendo a oxidação da LDL acumulada na matriz subendotelial (4,17,31).

Outro mecanismo muito estudado nessa doença é o da biodisponibilidade do NO•. Na aterosclerose o equilíbrio normal entre a formação de NO• e outras ROS é interrompido, pois a ativação das células inflamatórias durante a aterogênese promove um aumento na atividade dos complexos enzimáticos oxNADPH e XO, entre outros, levando ao aumento nos níveis de ROS (32,33). Esse excesso de ROS promove o desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) o que resulta na diminuição da síntese de NO• e aumento da produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  (34). Concomitantemente, essa superprodução de  $\bullet\text{O}_2^-$  também contribui para a diminuição da biodisponibilidade do NO•, uma vez que a reação entre estas ROS forma ONOO<sup>-</sup>, um intermediário altamente reativo e prejudicial às biomoléculas orgânicas (35).

Todo esse processo em conjunto que gera o aumento do estresse oxidativo na aterosclerose pode levar a danos celulares importantes e prejuízo da função em alguns tipos de células como as HSC. Desta forma, em condições de aumento do estresse oxidativo um tratamento antioxidante pode ser conveniente para reduzir a produção de ROS, surgindo como uma alternativa para evitar o dano celular.

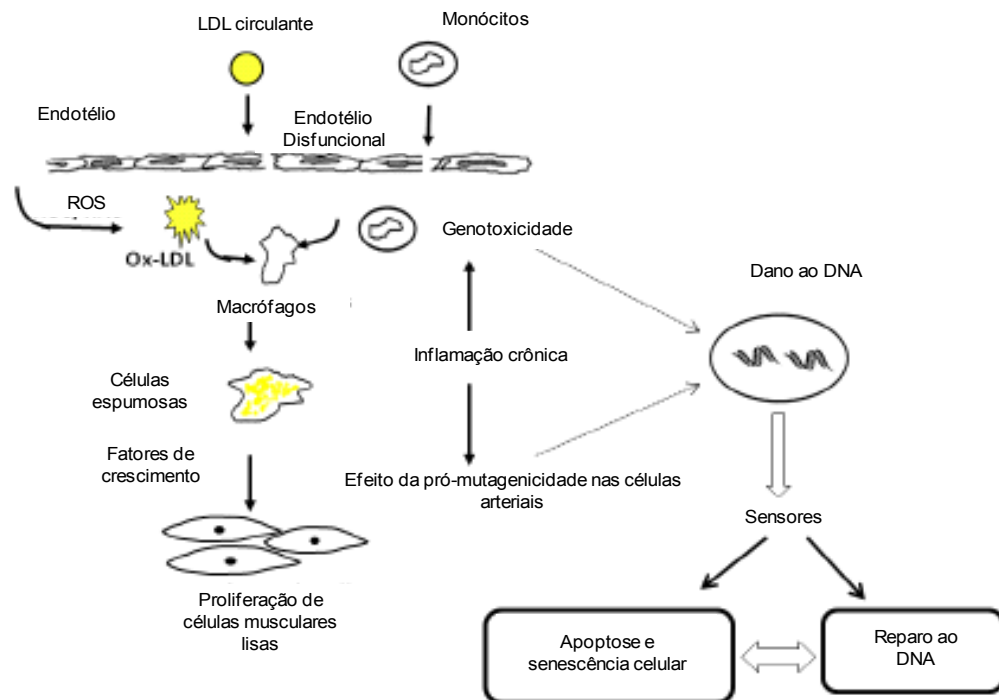
Os altos níveis de ROS encontrados na aterosclerose são importantes mediadores de danos nos componentes celulares, tais como hidratos de carbono, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (36). Os radicais livres são capazes de causar vários tipos de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), os principais tipos são quebras de fitas simples ou duplas, modificação de bases, sítios abásicos, *crosslinks* de DNA com DNA e proteínas (37).

Portanto, o aumento dos níveis de ROS, como o observado na aterosclerose, é considerado um importante agente genotóxico devido a sua capacidade de causar danos ao DNA podendo, assim, alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a célula é exposta a um agente genotóxico, o que pode levar a alterações na estrutura ou no conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (38). Desse modo, o aumento nos níveis de ROS pode levar a genotoxicidade, podendo contribuir, assim, para o desenvolvimento ou progressão da aterosclerose (figura 4).



**Figura 4:** Esquema hipotético ilustrando o papel de ROS e diminuição da biodisponibilidade de NO• na disfunção vascular em condições de hipercolesterolemia e aterosclerose. Adaptado de Vasquez, *et al.* 2012 (9).

Muitos estudos mostram a presença de danos na molécula de DNA tanto nos linfócitos da circulação quanto nas placas ateroscleróticas de indivíduos doentes (39,40). A maior parte dos danos é causada pelas ROS, o dano oxidativo ao DNA pode ocorrer de diferentes formas, causando oxidação de bases específicas ou quebras de cadeia (41), o que pode conduzir a instabilidade genômica e alterações permanentes no material genético ou elevar a indução de morte celular programada (apoptose). Adicionalmente, o excesso de dano pode gerar uma sobrecarga do sistema de reparo do DNA, diminuindo sua capacidade (figura 5).



**Figura 5:** Visão simplificada da atuação de ROS no dano ao DNA na aterosclerose. Adaptado de Cervelli, *et al.* 2012 (42).

### 1.3.3 Estresse oxidativo, aterosclerose e apoptose

Outra forma celular de resposta à lesão, como as causadas por excesso de ROS, é a superexpressão da proteína supressora tumoral p53 (43). Em

caso de danos moderados ao DNA a proteína p53 promove uma parada transitória do ciclo celular, permitindo que as células reparem seu DNA antes de entrarem na fase S. Se o dano ao DNA for grave e talvez além da capacidade de processos de reparo, a célula pode sofrer necrose ou apoptose. A ativação pronunciada da enzima Poly [ADP-ribose] polymerase 1(PARP-1) (como resultado de extensas quebras na cadeia do DNA) induz um alto consumo de energia para promover o reparo, o que leva a uma depleção de energia da célula e, consequente, morte celular por necrose (44). A apoptose, por outro lado, pode ser acionada através da regulação de p53 dependente de fatores pró-apoptóticos (44).

As quebras de cadeia no DNA levam a fosforilação e ativação da p53. E estudos têm demonstrado que esse fenômeno desempenha um papel importante na progressão da aterosclerose, porque a ausência de p53 acelera aterogênese, aumentando a proliferação celular *in vivo* (45). Trabalhos demonstram que a PARP-1 interage diretamente com os fatores pró-apoptóticos importantes na ativação da p53 e regulação do reparo ao DNA após o dano (46).

#### 1.4 TERAPIA ANTIOXIDANTE

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesas antioxidantes. Esse estado de equilíbrio protege os tecidos e líquidos corporais da lesão causada pelos pró-oxidantes produzidos pelo metabolismo normal (47). As defesas antioxidantes permitem ao organismo tolerar o estresse oxidativo leve e moderado. Assim sendo, compostos com propriedades antioxidantes podem prevenir a injúria causada pelas ROS na aterosclerose.

##### 1.3.1 Monofosfato Cíclico de Guanosina e Fosfodiesterases

O monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) regula diversas respostas fisiológicas, como o tônus vascular e exerce seus efeitos por meio da ativação

de diferentes efetores, tais como proteínas quinase (PK) mediadas por GMPc e canais iônicos dependentes de GMPc e fosfodiesterases (PDEs) (48).

No músculo liso, diversos processos metabólicos e mecânicos são regulados por GMPc, normalmente de maneira bem rápida sendo o tônus contrátil do músculo o melhor exemplo de como isso acontece. Mudanças lentas reguladas por esse mesmo nucleotídeo cíclico incluem o controle da proliferação celular em resposta a injúrias (49).

A amplitude e duração da sinalização mediada por GMPc depende da relação entre as taxas de produção e degradação (49). Sua produção ocorre a partir da ativação da enzima guanilato ciclase (GC), que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (48).

A degradação do GMPc ocorre pela ação de enzimas da família das fosfodiesterases (PDEs), que compreende um gama de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos, de modo que são cruciais na modulação da sinalização citoplasmática desses segundos mensageiros (50). Atualmente sabe-se que há 11 famílias de genes que expressam PDEs em tecidos de mamíferos e que são responsáveis pela síntese de diferentes isoformas de PDEs (PDE1 a PDE11, incluindo subtipos) (49).

A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) é específica para GMPc e está presente em CML dos corpos cavernosos do pênis, de vasos periféricos arteriais e venosos, bem como na circulação coronária e pulmonar, e nas plaquetas (51). Em condições basais, é a isoforma mais ativa na hidrólise de GMPc no músculo liso vascular (49).

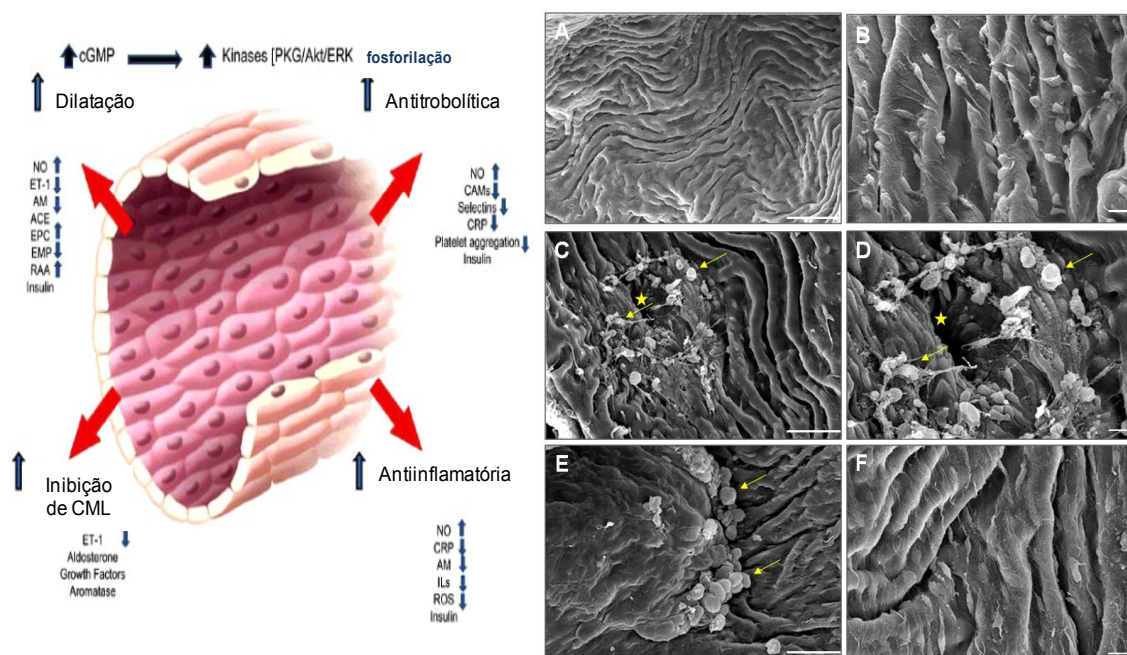
### **1.3.2 Inibidor da fosfodiesterase tipo 5**

Os inibidores das PDEs elevam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos. Devido à diversidade de isoformas e sua distinta distribuição pelos tecidos, inibidores seletivos para diferentes isoenzimas da família das PDEs tornam-se ferramentas farmacológicas promissoras. O sildenafil é um inibidor

potente e seletivo da PDE5 e é uma droga vasoativa amplamente utilizada no tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar (47,52). Adicionalmente, um recente trabalho do nosso laboratório demonstrou que essa droga também tem a capacidade de restaurar a função endotelial (53).

Como a PDE5 hidrolisa especificamente o GMPc, sua inibição promove a diminuição da degradação desse nucleotídeo (47,51,53,54). Como os níveis de GMPc circulantes modulam a atividade endógena do NO• e consequentemente o tônus vascular, o seu aumento altera a sinalização mediada NO•/GMPc (47,51–53,55).

Além da capacidade de restaurar a função endotelial (figura 6) (53) existem evidências experimentais de que o sildenafil pode diminuir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (29,47,51,54,56–60). Destarte, seria razoável propor seu uso para prevenir os prejuízos causados pelo aumento da produção de ROS na aterosclerose.



**Figura 6:** Ação do inibidor da fosfodiesterase 5 (sildenafil) sobre o endotélio. À esquerda efeitos do uso diário de inibidores da PDE5 no endotélio (Adaptado de Aversa *et al.* 2008 (61)). À direita fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a superfície endotelial normal em animais controles (A e B); C e D apresentam a superfície endotelial de animais ateroscleróticos apoE<sup>-/-</sup> que receberam apenas veículo, é possível observar a irregularidade e descontinuidade do endotélio (estrela) e o acúmulo de células sanguíneas e fibrina sobre a superfície endotelial (setas); em E e F o tratamento com sildenafil foi capaz de



reverter parcialmente a descontinuidade endotelial, embora ainda se observe a adesão de células sanguíneas (setas). A barra de escala em A, C e E corresponde a 50  $\mu\text{m}$  e em B, D e F, a 10 $\mu\text{m}$  (Adaptado de Balarini *et al.* 2013 (53)).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A aterosclerose é uma doença cardiovascular inflamatória cujo desenvolvimento é resultado de distúrbios metabólicos, estresse oxidativo e ação de mediadores pró-inflamatórios. O aumento na produção de ROS e diminuição das defesas antioxidantes leva a um quadro de desequilíbrio e estresse oxidativo que tem papel importante no desenvolvimento e progressão da doença.

Atualmente, existem poucos estudos que demonstrem a participação das vias de estresse oxidativo, dano ao DNA e capacidade do sistema de reparo do DNA em HSCs de animais ateroscleróticos. Portanto, este estudo será um dos pioneiros ao avaliar quantitativamente a participação do sistema oxidante e antioxidante, a genotoxicidade, a atuação do sistema de reparo do DNA e níveis de apoptose no impacto da aterosclerose sobre HSCs, importante fonte regenerativa de animais saudáveis e doentes, por meio de técnicas de biologia molecular e celular. Assim como, avaliar os benefícios de uma possível terapia antioxidante sobre esse tipo celular.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do sildenafil sobre as vias do estresse oxidativo, genotoxicidade, sistema de reparo do DNA e níveis de apoptose em células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos ateroscleróticos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar, em células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos apoE<sup>-/-</sup> machos o efeito da aterosclerose e do sildenafil sobre:

- Os níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, radical hidroxila, óxido nítrico);
- A participação dos sistemas pró-oxidantes NADPH oxidase e xantina oxidase na produção de ROS;
- A participação dos sistemas antioxidantes superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase na redução de ROS;
- O dano oxidativo ao DNA;
- A cinética de reparo do DNA;
- A apoptose.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

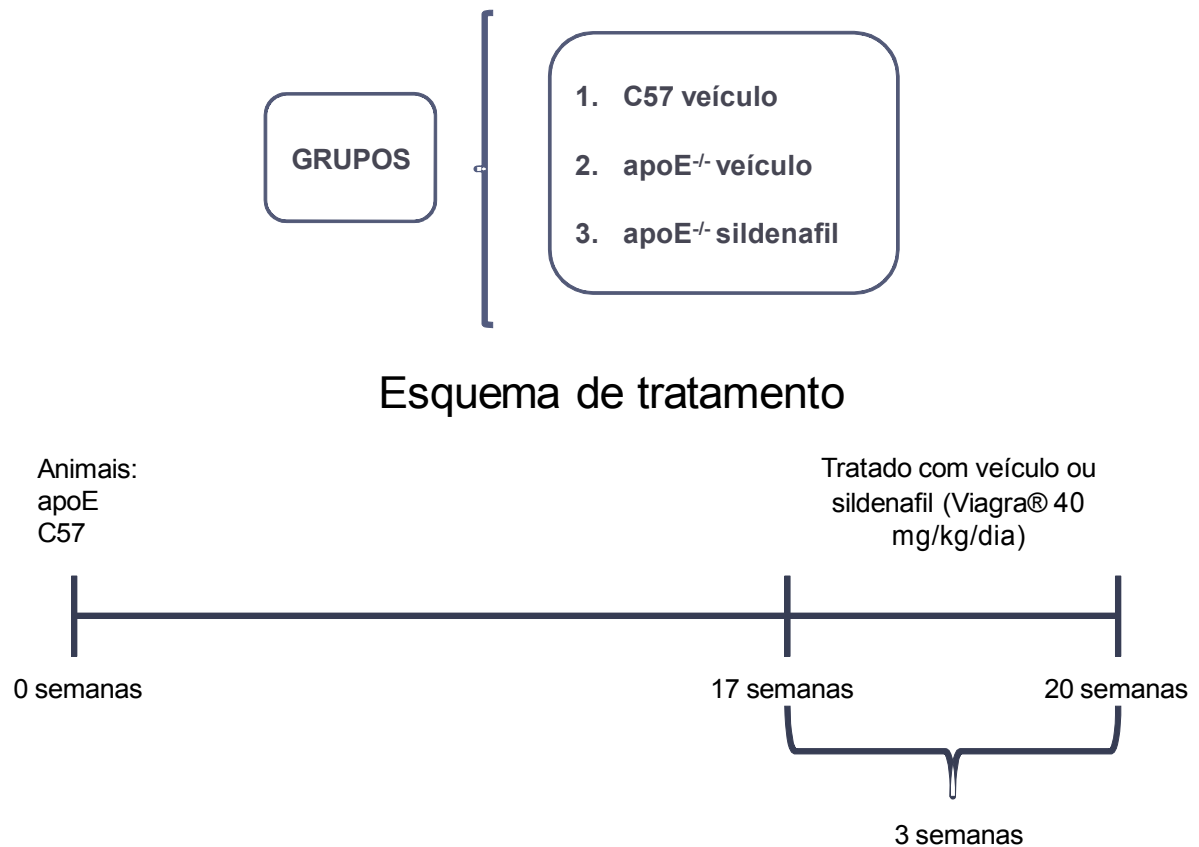
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) controles (C57black/6; n=6-8 por grupo) e ateroscleróticos (apoE<sup>-/-</sup>; n=5-8 por grupo) machos (figura 7), com 20 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), com garantia de serem animais isogênicos, ou seja, filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura (22±2°C) e umidade (70%) do ambiente. A utilização e o manuseio experimental dos animais neste biotério estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e foram realizada mediante a prévia aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (Emescam), protocolo número 010/2009.



**Figura 7:** Modelo murino para estudo da aterosclerose pela inativação do gene da apolipoproteína E (apoE *knockout*) proveniente do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal do Espírito Santo.

## 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com 17 semanas de idade os animais foram distribuídos em três grupos: (1) C57 controle tratado com o veículo (C57 veículo, água, durante 3 semanas, por meio de gavagem oral); (b) apoE<sup>-/-</sup> tratado com o veículo (apoE<sup>-/-</sup> veículo, água, durante 3 semanas, por meio de gavagem oral); (3) apoE<sup>-/-</sup> tratado com o inibidor de PDE5 sildenafil (apoE<sup>-/-</sup> sildenafil, Viagra®, 40 mg/kg/dia, durante 3 semanas, por meio de gavagem oral) (figura 8).



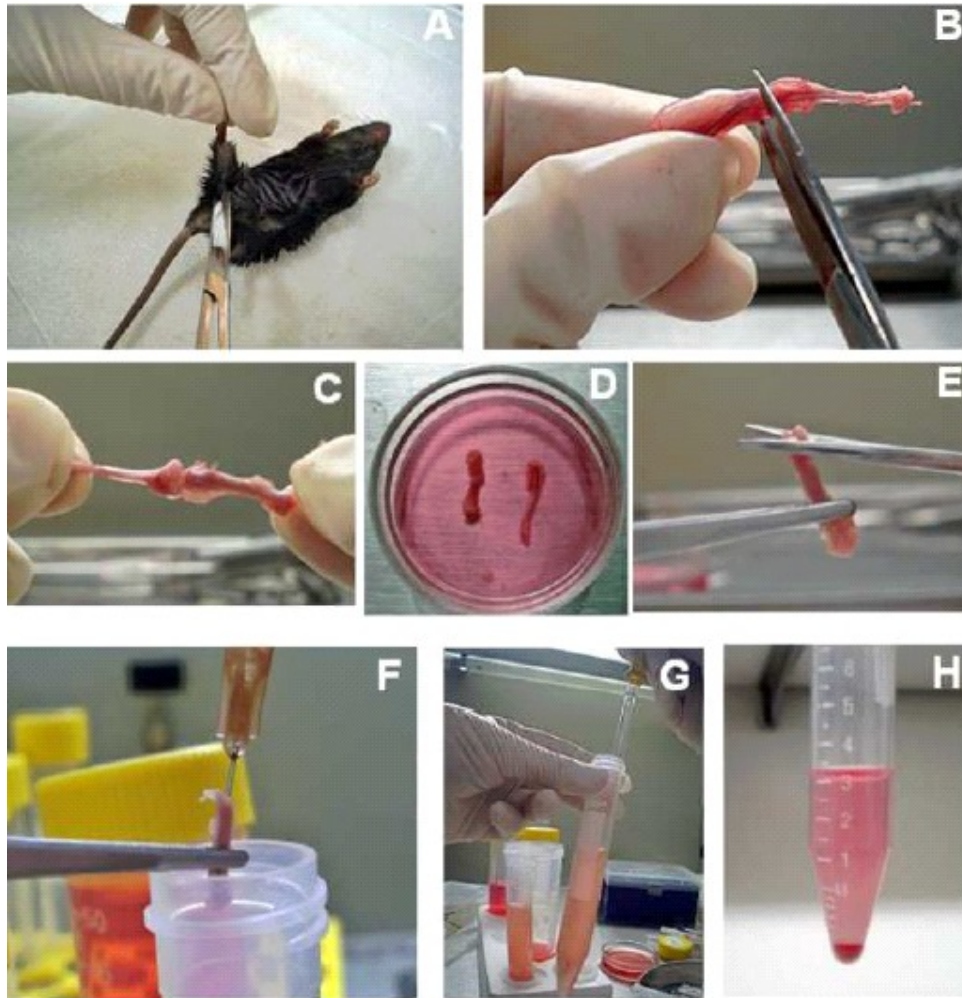
**Figura 8:** Grupos experimentais e esquema de tratamento dos animais.

#### 4.3 COLETA DE SANGUE E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

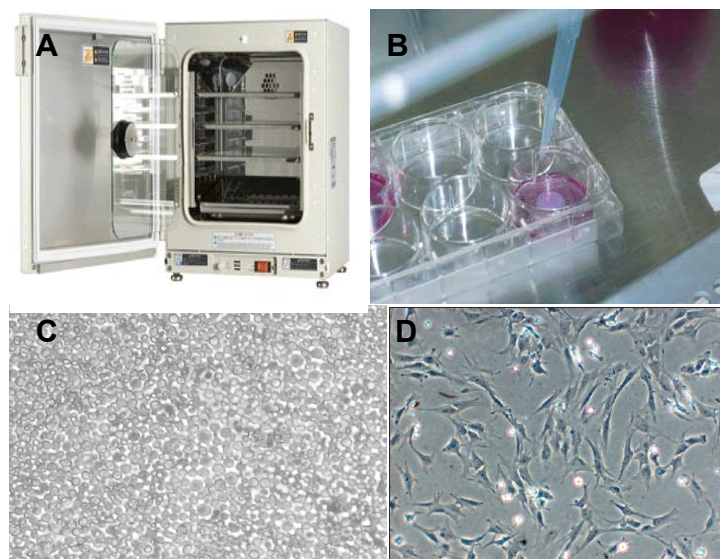
Para o isolamento das células-tronco os animais foram selecionados de modo pareado. Todo o material utilizado no experimento foi previamente esterilizado para evitar contaminação. Após serem eutanasiados, com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (100mg/kg), os animais foram levados para a capela de fluxo laminar e higienizados com álcool 70%. A coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca do ventrículo direito para realização de análises bioquímicas.

Em seguida, foram retiradas as patas traseiras cuidadosamente, retirando a pele, para evitar contaminação com pelo. As patas foram colocadas em um prato estéril contendo DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma). Foi realizada a limpeza dos músculos e tendões das tíbias e fêmures com uma

tesoura de micro-dissecação. Os ossos foram colocados em gaze estéril e, em seguida, esfregados com cuidado para remover o tecido mole anexo do osso. Com o auxílio de uma pinça foram removidas as epífises para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea foi utilizada uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa de 1 mL para realização do *flush*, utilizando meio de cultura DMEM. A amostra contendo a suspensão de medula óssea foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 400g (figura 9). Após o isolamento, as células foram ressuspensas em 3 ml de meio completo (MC: DMEM, 15mM HEPES, 20% Soro fetal Bovino e 1% antibiótico – penicilina/streptomicina; Gibco), colocadas em placas de cultura de 6 poços e levadas para incubadora com filtro HEPA (Sanyo) à 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas a fração contendo células-tronco hematopoiéticas fica em suspensão e pode ser coletada por aspiração, enquanto as células-tronco mesenquimais aderem à placa de cultura (figura 10). As células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM e uma alíquota separada para contagem em câmara de Neubauer.



**Figura 9:** Isolamento de células-tronco hematopoiéticas. Retirada do fêmur e da tíbia do camundongo (A-C), ossos isolados e limpos em meio de cultura (D), remoção das epífises (D), *flush* da medula óssea (F), homogeneização e centrifugação da medula (G-H).



**Figura 10:** Cultura celular. Incubadora com filtro HEPA (Sanyo) (A); Suspensão de células da medula óssea em placa de cultura (B); Células-tronco hematopoiéticas (C); Células-tronco mesenquimais (D).

#### 4.4 MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO

As amostras de sangue obtidas por punção cardíaca do ventrículo direito foram imediatamente transferidas para um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) e centrifugadas à 400g por 10 min para a separação do plasma. O colesterol plasmático total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), LDL e triglicerídeos foram determinados através de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil – figura 11). As VLDL e as IDL foram estimadas subtraindo HDL e LDL do colesterol plasmático total.



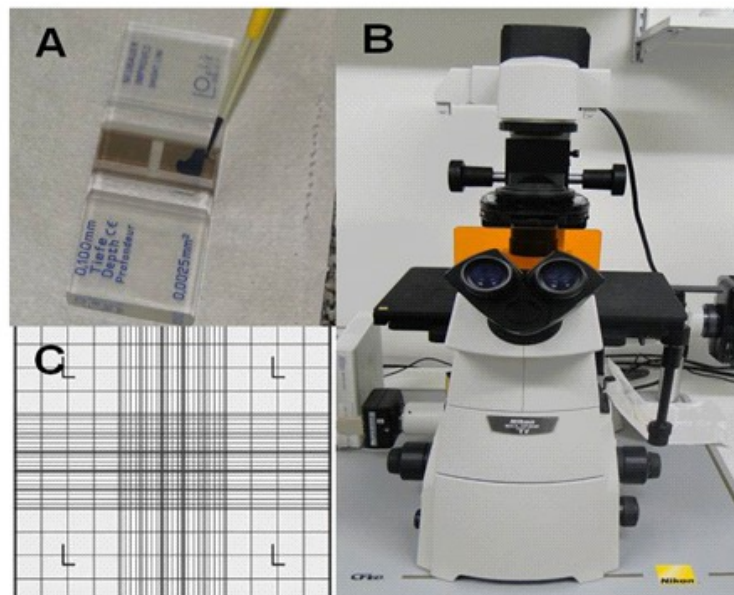
**Figura 11:** Medida do perfil lipídico. Espectrofotômetro com detalhe dos kits Bioclin usados nos ensaios colorimétricos.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPIÉTICAS

Para determinação do número obtido de células, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular em PBS. Em seguida, uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno), e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripan 0,4%. A solução (células/Turck/Tripan) foi homogeneizada, colocada na câmara de Neubauer e quantificada com auxílio do microscópio óptico no aumento de 40X. As células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes (figura 12). Foram realizadas 3 contagens independentes e a média do



número de células será calculado pela equação:  $Q = \text{fator de diluição} \times 10^4 \times \text{volume} \times \text{total de células} / 4$ . Este é um procedimento padrão indispensável em diferentes situações de manipulação de cultura de células-tronco. A viabilidade das células foi determinada pelo o método de exclusão do corante azul de Tripán durante a contagem em câmara de Neubauer. Por este método, as células mortas coram em azul, uma vez que sua membrana é permeável ao corante, já a membrana das células vivas não é permeável e, portanto, estas não coram. Desta forma, ao visualizar as células ao microscópio observamos que as células mortas são azuis e as vivas transparentes. Para calcular a viabilidade celular, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer e o valor obtido multiplicado por 100, fornecendo um valor em porcentagem.

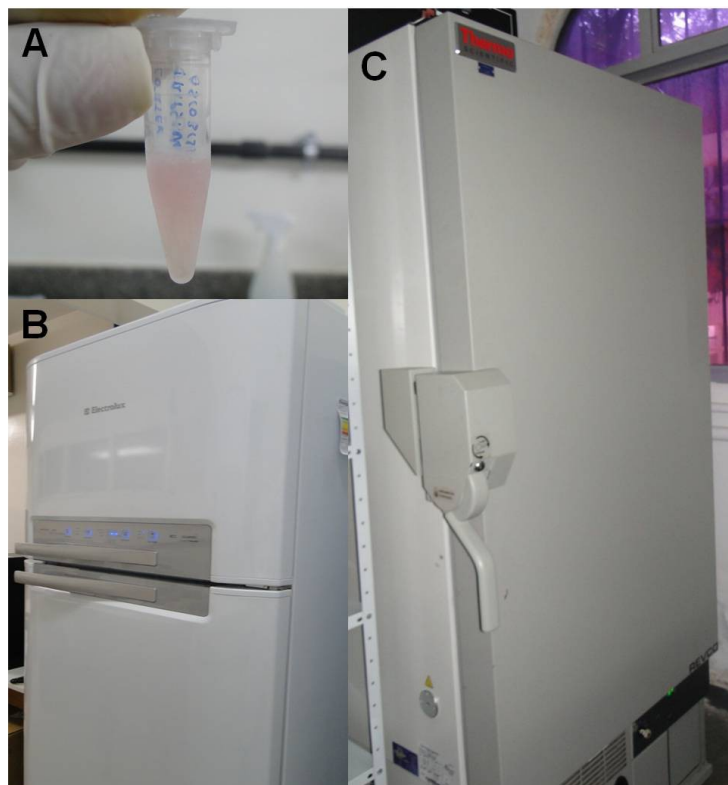


**Figura 12:** Contagem celular e análise de viabilidade em câmara de Neubauer. Suspensão de células misturada com azul de tripano (A), a análise foi feita em microscópio óptico (B), no aumento 40x, as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara (C).

#### 4.6 CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de HSC foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Em seguida as amostras para análises foram ressuspensas em solução de criopreservação (95% soro fetal bovino – Gibco e 5% de dimetil sulfoxido - Sigma-Aldrich) (figura 13A). Os tubos contendo as amostras foram levados à temperatura de -20°C por 24

horas (figura 13B) e depois armazenados em freezer -80°C até o momento da execução dos protocolos experimentais (figura 13C).



**Figura 13:** Congelamento da amostra. Suspensão de células em solução de armazenamento (A), freezer -20°C (B), freezer -80°C (C).

#### 4.7 ENRIQUECIMENTO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

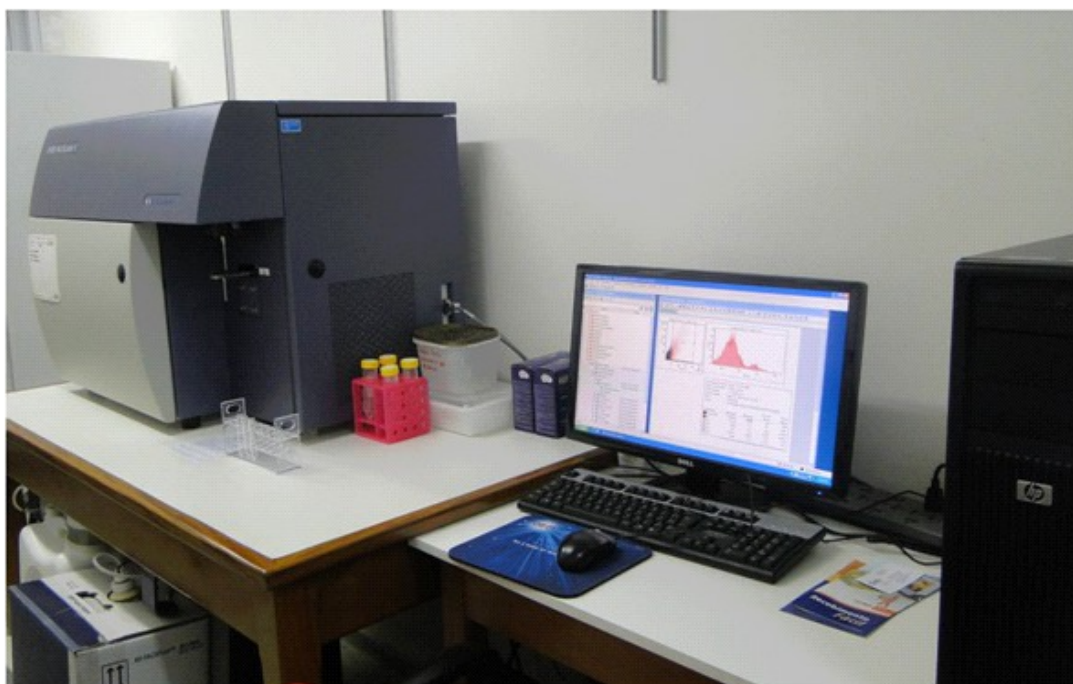
A suspensão de células ( $1-2 \times 10^7$  céls/mL) passou por um processo de imunodepleção magnética a fim de enriquecer as HSC da amostra. Esse processo consiste em marcar células diferenciadas com diferentes anticorpos: CD3e (CD3  $\epsilon$  chain), CD11b (Integrin  $\alpha$ M chain), CD45r/b220, Ly-6G e Ly-6C(Gr-1), TER-119/Erythroid Cells (Ly-76) para excluí-las da amostra de interesse. O kit utilizado foi o Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment Set (BD). Em resumo, a suspensão de células foi marcada com 25 $\mu$ L do coquetel de anticorpos (Lin) descrito acima por 15 minutos, lavada e posteriormente marcada com *beads* (esferas) magnéticas por 30 minutos à temperatura de 6°C. Essa suspensão foi colocada em coluna magnética e a fração Lin<sup>+</sup> era

atraída, portando as células de interesse (HSC não marcadas, fração Lin<sup>-</sup> foram coletadas facilmente para posterior análise (62).

#### 4.8 IMUNOFENOTIPAGEM

Após a imunodepleção magnética, foi retirada uma alíquota para identificação e confirmação de HSC por análise imunofenotípica para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular. Para isso foram utilizados os anticorpos contra Sca-1 (BD), CD133 (eBioscience, San Diego, CA, EUA), CD117 (BD), CD90.2 (BD) associados a diferentes fluorocromos e seus respectivos controles de isotipo. As células foram incubadas com 5µL de anticorpo marcador ou anticorpo controle no escuro por 30 minutos à temperatura de 4°C. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, por fim, foi feita a aquisição de 10.000-50.000 eventos no citômetro de fluxo (FACSCanto II – Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, EUA) acoplado a um computador (figura 14).

Os dados adquiridos foram analisados pelos softwares FACSDiva (BD) e PCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, EUA). No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada.



**Figura 14:** Citômetro de fluxo FACSCanto II e software FACSDiva.

#### 4.9 MEDIDA DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPASMÁTICOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os níveis de ROS foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) e pelo etídeo, que são produtos da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) e do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE), compostos sensíveis, principalmente, ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e aos ânions superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), respectivamente. O  $H_2DCFDA$  é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o  $H_2DCFDA$  perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado a DCF, composto altamente fluorescente evidenciando o acúmulo intracelular de ROS (63). Outras ROS, como  $NO\bullet$ ,  $ONOO^-$  e  $LOO\bullet$  podem oxidar o DCFH. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, também entra livremente na célula e é relativamente mais sensível ao  $\bullet O_2^-$ , entretanto pode reagir com outras ROS, como o  $\bullet OH$ , para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se

liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (64,65).

As populações HSCs foram isoladas, coletadas separadamente, lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de  $10^6$  células/ml. As amostras foram incubadas, no escuro, com solução de 10  $\mu$ M  $H_2DCFDA$  (66–68) e DHE (160  $\mu$ M) em etanol absoluto, por 30 minutos à 37 °C e, em seguida, mantidas resfriadas (4 °C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488 nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585nm para etídeo e 530 nm para DCF. Como controle positivo, a cultura celular foi previamente incubada com 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  ou 100 $\mu$ M de doxorubicina por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol.

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do  $NO\bullet$  foi usado o marcador diacetato 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2mM), que na presença de  $NO\bullet$ , emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional a biodisponibilidade intracelular de  $NO\bullet$ . Este corante foi adicionado à suspensão de HSC e incubado à 37°C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 $\mu$ M de nitroprussiato de sódio (60).

A medida de  $ONOO^-$  e  $\bullet OH$  foi realizada com a probe hidroxifenil fluoresceína (HPF, Invitrogen), quando oxidada exibe fluorescência verde (excitação/emissão máxima: 490/515nm) (69). A análise dos dados foi realizada com auxílio do *FACSDiva*, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DAS VIAS PRÓ-OXIDANTES

Para avaliar a contribuição das vias do sistema NADPH oxidase (oxNADPH) e xantina oxidase (XO) para o desenvolvimento e manutenção dos altos níveis de ROS foram realizados bloqueios específicos dessas vias envolvidas na produção de ROS. Para determinar a contribuição de cada via nas HSC, foram utilizados os seguintes bloqueios: apocinina (Sigma) na

concentração de 600  $\mu\text{M}$  por 10 minutos para avaliar a influência da oxNADPH; alopurinol (Sigma) na concentração de 100  $\mu\text{M}$  por 10 minutos para avaliar a participação da XO na produção de ROS (70,71). Decorrido este tempo, as células foram novamente marcadas, no escuro, com DHE e DCF, por 30 minutos à 37°C para posterior aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DAS VIAS ANTIOXIDANTES

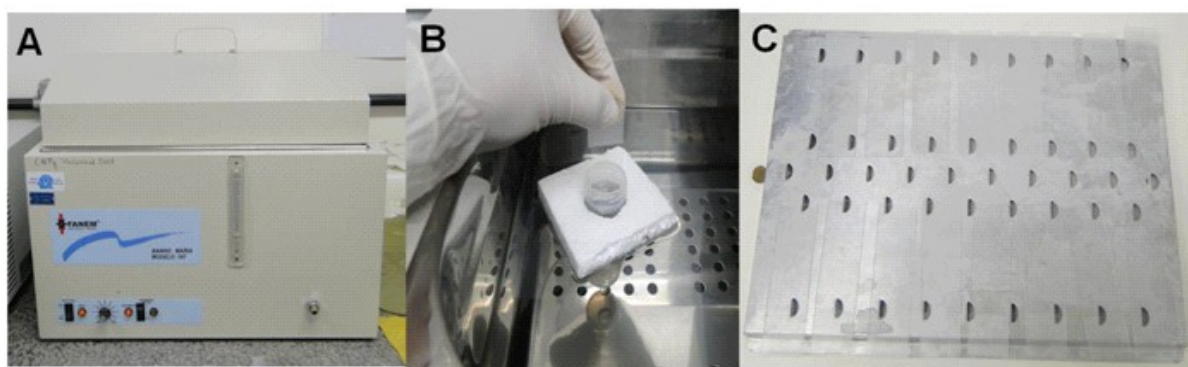
Para avaliar as vias antioxidantes três principais enzimas foram analisadas, com o objetivo de verificar o balanço entre a síntese e remoção de ROS. Para essa avaliação foi realizada a inibição da superóxido desmutase (SOD) com a droga DDC a 500  $\mu\text{M}$  por 16 horas, a catalase (CAT) foi bloqueada 2 horas com 20 mM de 3-AT e a glutathione peroxidase (GPx) foi inibida com ácido mercaptossuccínico na concentração de 0,05 mM por 2 horas (72–74).

#### 4.12 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade foi analisada utilizando eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) sob condições alcalinas, seguindo protocolos estabelecidos em nosso laboratório (75–77), com base em Singh et al., 1988 (78), com modificações e sob baixa luminosidade e temperatura controlada, devido à foto e termossensibilidade do ensaio.

##### 4.12.1 Preparo das lâminas

Lâminas histológicas lisas de extremidade fosca foram pré-revestidas com uma primeira camada de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* – NMP; Gibco) 1,5% dissolvida em PBS e mantida a 65°C, e colocadas pra secar a temperatura ambiente *overnight* (figura15).



**Figura 15:** Primeira camada de agarose. Banho-maria a 65°C (A), banho de agarose NMP na lâmina (B), lâminas com primeira camada (C).

Para a preparação da segunda camada cerca de  $2 \times 10^4$  células foram misturadas com 100  $\mu$ l de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose* – LMP - Gibco) 0,6%, dissolvida em PBS e mantida a 37°C. A mistura contendo agarose LMP e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas com a primeira camada (figura 16A) e cobertas com uma lamínula (figura 16B) e resfriadas a 4°C por 30 minutos para a polimerização da agarose.

#### 4.12.2 Lise, tratamento, desenovelamento e eletroforese

Após a polimerização as lamínulas foram gentilmente removidas e as lâminas imersas em solução de lise gelada e recém-preparada, contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 34 mM N-lauroylsarcosine de sódio, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, esses dois últimos acrescentados no momento de uso. A lise ocorre por 1 hora a 4°C sob proteção contra a luz, para rompimento das membranas celulares (figura 16C).

Após a lise, as lâminas foram lavadas 3 vezes com o *enzyme dilution buffer* gelado. Cada lâmina foi incubada ou com 50  $\mu$ L de solução contendo a enzima endonuclease III (Endo III, diluição 1:1000 – Sigma) por 30 minutos à 37°C, ou com de solução contendo a enzima formamidopyrimidine\_DNA-glicosilase (FPG, diluição 1:1000 – Sigma) por 45 minutos à 37°C ou com apenas *enzyme dilution buffer*.

Após, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, Califórnia, EUA) e cobertas com solução tampão alcalina (pH>13) refrigerada a 4°C, preparado com 300mM NaOH e 1mM EDTA. Para a etapa de desenovelamento do DNA as lâminas foram deixadas submersas nessa solução tampão por 40 minutos (figura 16D).

Com as lâminas já dispostas na posição para a corrida, as condições de eletroforese foram ajustadas a 20V, amperagem a 300mA por aumento ou diminuição do volume da solução tampão, e tempo de corrida 20 minutos (figura 16E).

Ao término da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e submetidas à etapa de neutralização, com três lavagens de 5 minutos, em solução tampão neutro (Tris 0,4M, pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram cobertas por etanol P.A. por 5 minutos para fixação e deixadas secar a temperatura ambiente por 1 hora (figura 16F).

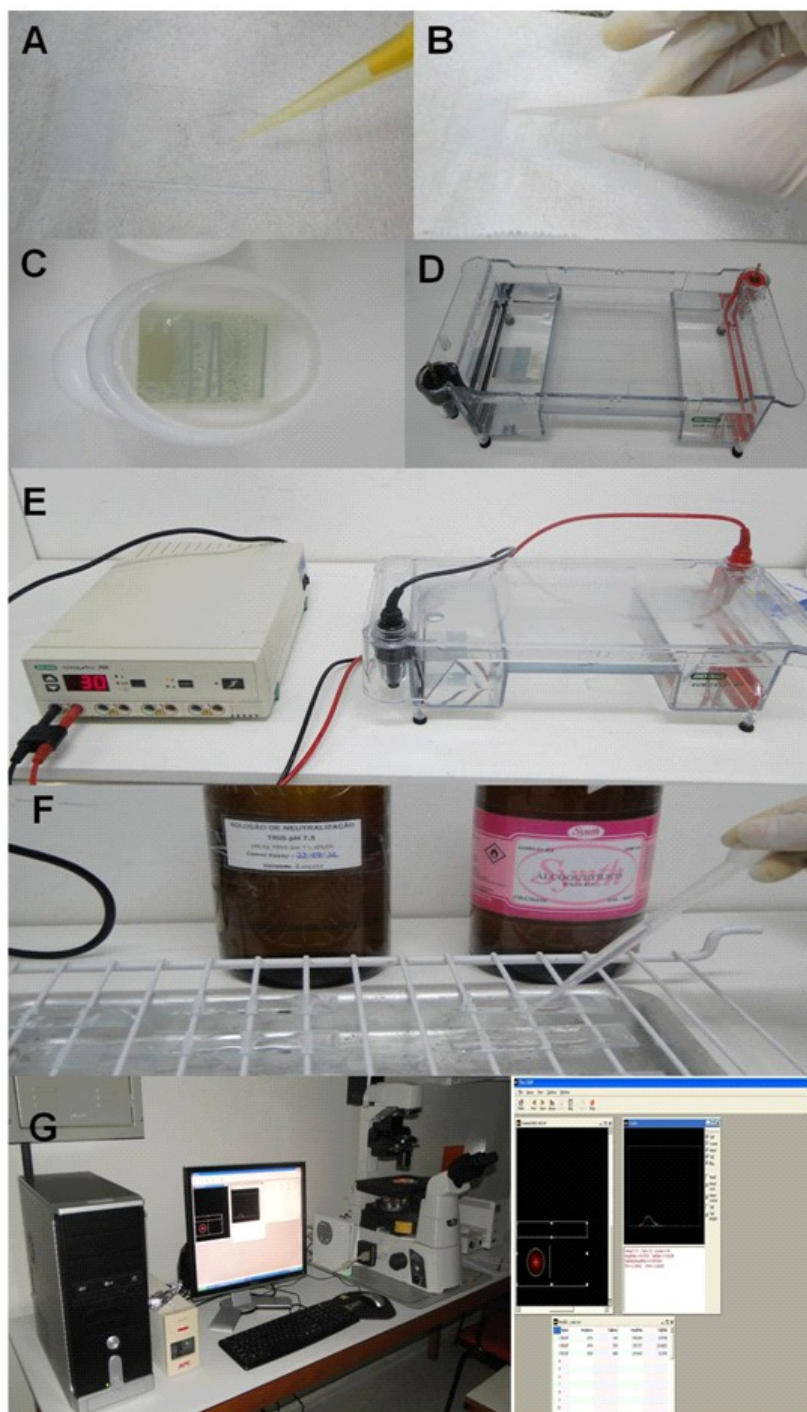
#### **4.12.3 Coloração e análise**

A coloração foi realizada com brometo de etídio na concentração de 20µg/ml. Foram adicionados 50µl da solução de uso sobre a lâmina e coberta por uma lamínula. A análise foi realizada imediatamente após a coloração, em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro de 585nm (G-2E/C; Nikon) com aumento de 20x. As imagens foram adquiridas através da câmera digital de 12.7 megapixels (Ds-Ri1; Nikon) (figura 16G).

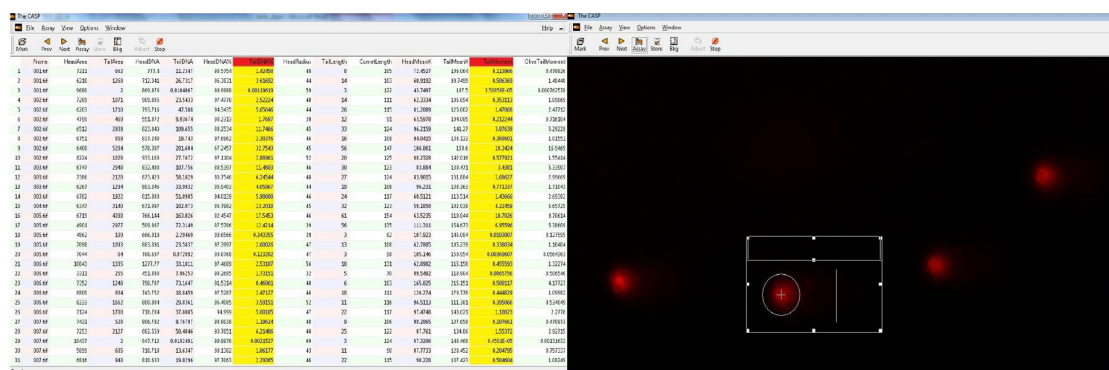
Foram analisadas duas lâminas por indivíduos e uma média de 25 cometas em cada lâmina. Para manter a imparcialidade as lâminas foram codificadas e analisadas em diferentes posições, evitando regiões de bordas e bolhas, onde a migração durante a eletroforese pode ocorrer de maneira irregular. Os cometas obtidos foram analisados através de sistema de análise de imagem. Foi utilizado o programa de domínio público CASP, desenvolvido por Końca *et al* (50) disponível em: [www.casp.of.pl](http://www.casp.of.pl).



O programa CASP fornece inúmeros parâmetros para quantificar a fragmentação do DNA em cada cometa. Dentre tantos parâmetros utilizaremos a porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda) (figura 17).



**Figura 16:** Ensaio cometa. Preparo da segunda camada de agarose (A), colocação da lamínula (B), etapa de lise (C), etapa de desenovelamento do DNA (D), eletroforese (E), neutralização e fixação (F), microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro de 585nm (G-2E/C; Nikon) e câmera digital de 12.7 megapixels (Ds-Ri1; Nikon), detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil (G).



**Figura 17:** Tabela de resultados fornecida pelo CASP. Todos os parâmetros de análise dos cometas (esquerda). Interface do programa CASP, destaque para o cometa selecionado (direita).

## 4.13 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPARO DO DNA

Para análise do sistema de reparo uma amostra de HSC (150  $\mu\text{L}$ ) foi incubada com 10  $\mu\text{L}$  de de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 $\mu\text{M}$ ) à 4°C por 1 hora. Após a incubação a amostra foi separada nas seguintes alíquotas:  $T_0$ = uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  para ensaio do cometa imediatamente após o dano;  $T_1$ = uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  para ensaio do cometa após incubação a 37°C por 3 horas;  $T_2$ = uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  para ensaio do cometa após incubação a 37°C por 12 horas. Em seguida, foi realizado o ensaio do cometa como descrito acima.

## 4.14 ANÁLISE VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR

Para determinação de viabilidade e apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante vital iodeto de propídeo (PI: *Propidium Iodide*), seguida de análise em citômetro de fluxo.

Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolipídio fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a

ligação da proteína anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose.

Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V+/PI+).

As HSC foram ressuspensas em 400 µl de tampão de ligação 1X (*Binding Buffer*® 1X: 10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl<sub>2</sub>) na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Em seguida, 100µl desta solução (1x10<sup>5</sup> células) foram transferidos para os tubos de citometria previamente identificados, onde foram acrescentados 5µl de anexina V-FITC e 5µl de PI, controles de compensação foram utilizados para reduzir a sobreposição espectral. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Por fim, 300µl de *Binding Buffer* 1X foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas em citômetro de fluxo no período máximo de 1 hora.

#### 4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média±EPM. As variáveis mensuradas apresentam distribuição Gaussiana conforme análise feita usando o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov. Por isso, foi realizada a análise estatística paramétrica utilizando análise de variância (ANOVA), completamente randomizadas, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni múltiplas comparações,

utilizando *GraphPad Prism 6 software* (La Jolla, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PERFIL LIPÍDICO

A Tabela 1 mostra a média dos valores do perfil lipídico de animais C57 veículo, apoE<sup>-/-</sup> veículo e apoE<sup>-/-</sup> sildenafil. Como esperado os grupos apoE<sup>-/-</sup> mostraram elevados valores de colesterol plasmático total (5 vezes), LDL (16 vezes) VLDL+IDL (31 vezes), e triglicerídeos (4 vezes) e os valores de HDL significativamente menores (4 vezes) comparados aos animais C57 veículo. O tratamento com sildenafil não alterou o perfil lipídico plasmático dos animais apoE<sup>-/-</sup>.

**Tabela 1:** Perfil lipídico plasmático

Parâmetros	Grupos		
	C57 vc	apoEvc	apoEsil
Triglicerídeos (mg/dL)	67,8 ± 5,3	247,1 ± 22,1**	270,9 ± 26,7**
Colesterol total (mg/dL)	101,2 ± 6,3	534,9 ± 28,2**	481,4 ± 25,6**
LDL (mg/dL)	7,4 ± 1,1	171,5 ± 14,1**	173,5 ± 9,5**
HDL (mg/dL)	83,3 ± 5,1	19,2 ± 5,9**	26,4 ± 6,5**
VLDL+IDL (mg/dL)	10,5 ± 1,9	344,2 ± 26,0**	276,7 ± 21,2**

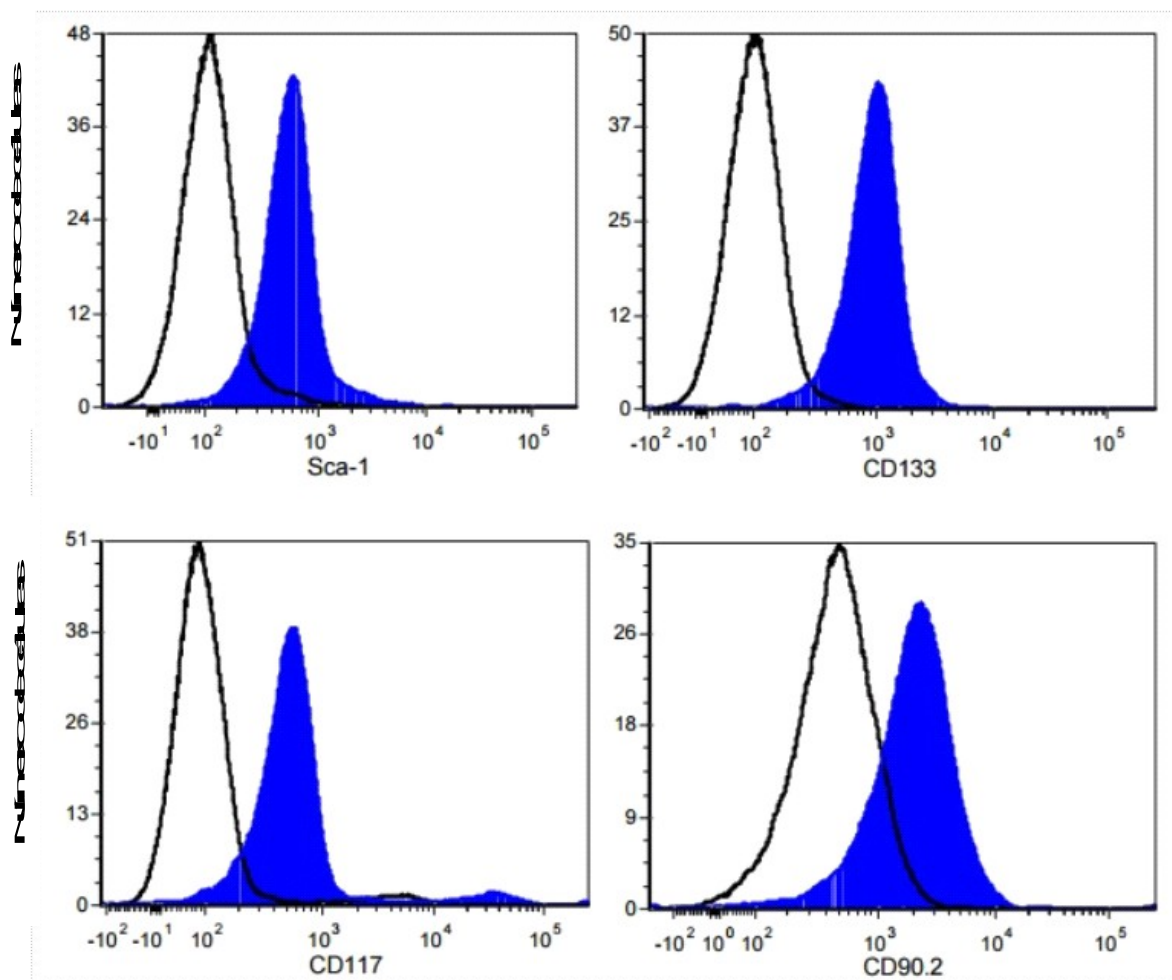
Os valores representam a média±EPM;

\*p<0,05 vs. C57 veículo (Anova)

### 5.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Para confirmar a presença de células tronco hematopoiéticas (HSC) nas amostras obtidas das medulas ósseas, foi realizada a imunofenotipagem através da citometria de fluxo. As HSC foram incubadas com anti-Sca, anti-CD133, anti-CD117 e anti-CD90.2 ou seus respectivos isotipos como pode ser observado na figura 18. Os dados obtidos por citometria de fluxo confirmaram a presença de HSC. Não houve diferença na intensidade de fluorescência entre

os grupos. Nos histogramas abaixo, o controle de isotipo está representado pela linha preta não preenchida, enquanto o anticorpo específico pode ser observado na linha azul preenchida.



**Figura 18** - Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas de camundongos C57. A linha preta não preenchida representa o controle de isotipo e a linha azul preenchida representa o anticorpo de marcação

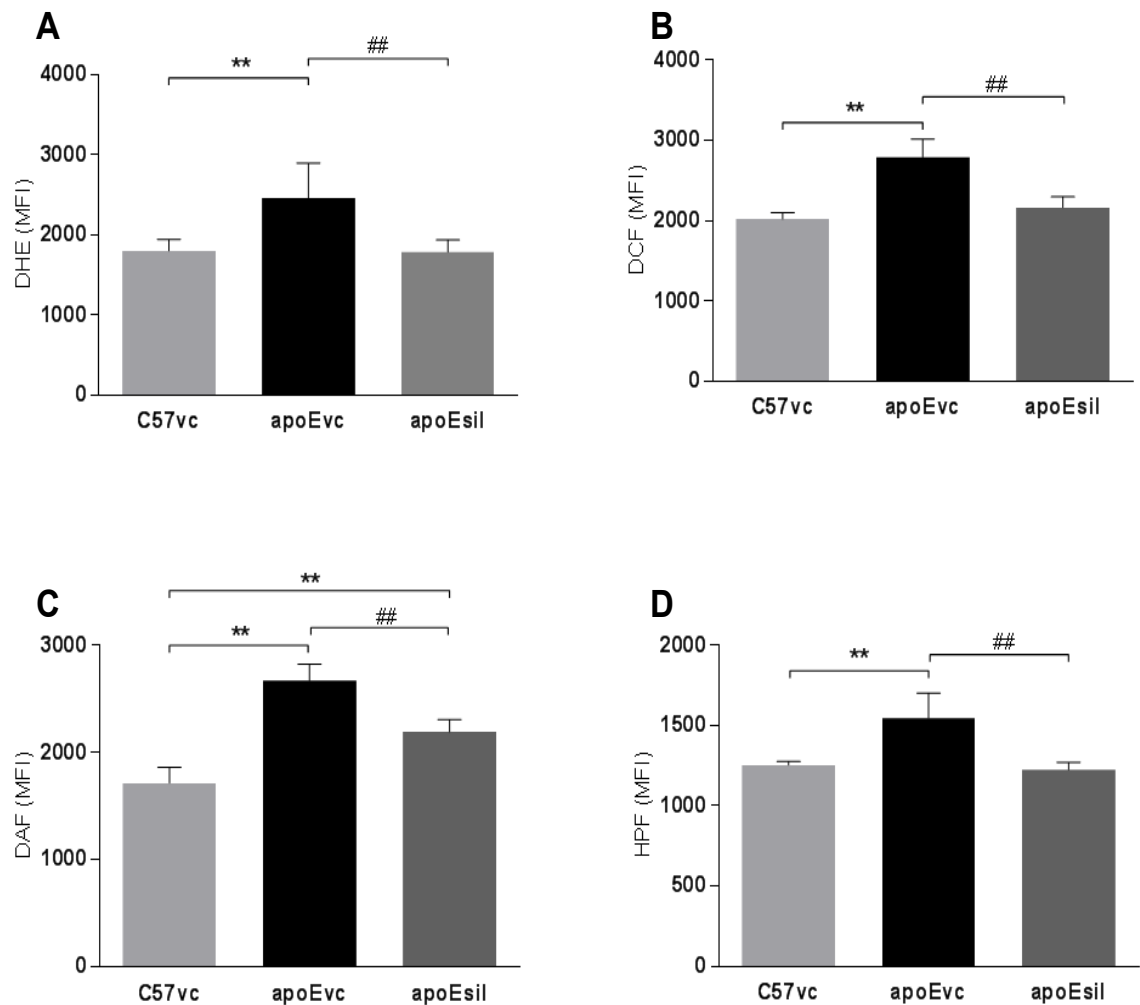
### 5.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Sabe-se que altos níveis de ROS podem levar a importantes prejuízos e danos às células. Por isso, foi realizada a quantificação dessas espécies reativas com diferentes marcadores. A sua presença foi indicada pela mediana da intensidade de fluorescência (MIF - a.u.).

Observou-se um aumento significativo de ROS em decorrência da aterosclerose. Os níveis de ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$  - sonda DHE) estavam aumentados nos animais apoE veículo (C57vc:  $1801 \pm 58$ ; apoEvc:  $2463 \pm 178$ ) e diminuídos nos animais ateroscleróticos tratados com sildenafil ( $1789 \pm 60$ ) (figura 19A).

Assim como, os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (sonda DCF) apresentaram um aumento nos animais apoE veículo (C57vc:  $2040 \pm 29$ ; apoEvc:  $2856 \pm 68$ ) e uma diminuição nos animais ateroscleróticos tratados com sildenafil ( $2142 \pm 49$ ) (figura 19B).

Quando comparados aos animais controle (C57vc) os níveis de  $\text{NO}\bullet$  (sonda DAF) estavam aumentados em cerca de 1,5 vezes nas HSC dos animais ateroscleróticos e 1,2 vezes nos animais apoE tratados com sildenafil, mas ainda assim os animais tratados tinham os níveis de  $\text{NO}\bullet$  significativamente menores (1,2 vezes) comparados aos animais apoE veículo (figura 19C). No entanto, os resultados da análise dos níveis de  $\text{ONOO}^-$  e  $\bullet\text{OH}$  (sonda HPF) mostraram um aumento nos níveis dessas ROS (1,2 vezes vs. C57vc) em animais apoE veículo, o que não foi observado nos animais ateroscleróticos tratados com sildenafil (figura 19D).



**Figura 19** – Efeito da aterosclerose e do tratamento com sildenafil sobre o estresse oxidativo em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. Os gráficos de barras apresentam diferenças na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) das diferentes ROS medidas por citometria de fluxo entre os grupos. Valores expressos como média±EPM, \* $p < 0,05$  vs. C57vc; # $p < 0,05$  vs apoEvc.

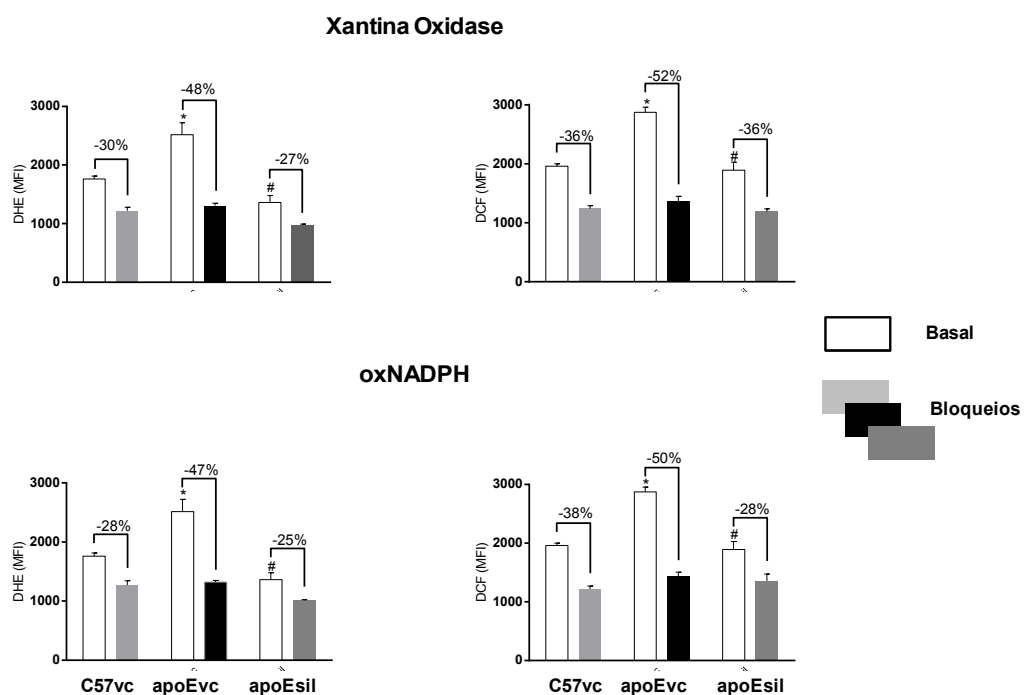
#### 5.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS VIAS PRÓ-OXIDANTES NADPH OXIDADASE E XANTINA OXIDASE

Sabe-se que os complexos enzimáticos oxNADPH e XO têm sua atividade aumentada na aterosclerose, levando a um aumento na produção de ROS característico da doença (32,33). No entanto, pouco se sabe sobre as vias envolvidas na produção de ROS em HSC ou, se a aterosclerose aumenta a influência das vias supramencionadas nessas células. Para essa análise foi realizado o bloqueio com drogas específicas dessas duas vias e medida a



intensidade de fluorescência com as sondas DHE e DCF. Como já observado anteriormente a produção de ROS em HSC dos animais apoE veículo é significativamente maior quando comparada aos animais controle, e que o tratamento com sildenafil promove a redução desses níveis. No entanto, observa-se que após os bloqueios os níveis de ROS se tornam semelhantes entre os grupos tanto pela via da XO quanto pela via da oxNADPH. Assim, após o bloqueio os níveis de ROS em HSC dos animais apoE veículo em ambas as vias tiveram uma redução mais acentuada (XO: DHE: -48%; DCF: -52% e oxNADPH: DHE: -47%; DCF: -50%) quando comparada aos animais controles (C57vc XO: DHE: -30%; DCF: -36% e oxNADPH: DHE: -28%; DCF: -38%) e aos animais tratados com sildenafil (apoEsil XO: DHE: -27%; DCF: -36% e oxNADPH: DHE: -25%; DCF: -28%) (figura 20). Esses achados demonstram uma maior influência dessas vias na produção de ROS em HSC em animais ateroscleróticos e que o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir essa influência.

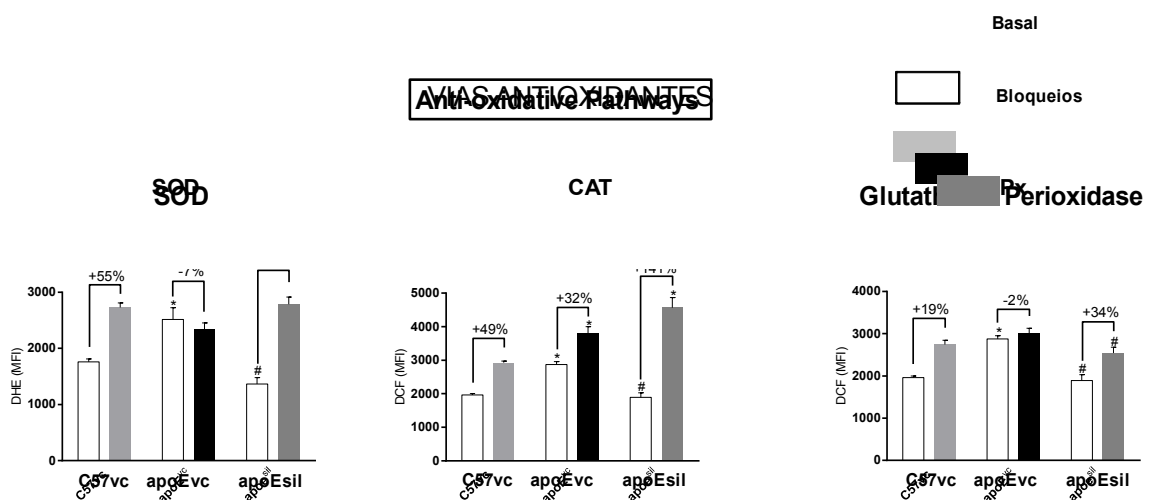
## VIAS PRÓ-OXIDANTES



**Figura 20** – Participação das vias pró-oxidantes xantina oxidase e NADPH oxidase na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil sobre essas vias em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. Os gráficos de barras mostram os efeitos dos inibidores das vias XO e oxNADPH na produção de ROS. As barras não preenchidas mostram a produção basal de ROS de cada grupo e as barras preenchidas mostram após o bloqueio. Abreviações: NADPH oxidase (oxNADPH). Valores expressos como média±EPM, \*p<0,05 vs. C57vc; #p<0,05 vs apoEvc.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS VIAS ANTIOXIDANTES

Em seguida, através de outro protocolo experimental foi avaliada a participação dos sistemas enzimáticos antioxidantes na manutenção das ROS. Nesse ensaio, o objetivo foi avaliar se a aterosclerose causava prejuízo nos seguintes sistemas antioxidantes: superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Os dados demonstram que, como já observado anteriormente, a produção de ROS em HSC dos animais apoE veículo é significativamente maior quando comparada aos animais controle, e que o tratamento com sildenafil promove a redução desses níveis. No entanto, ao analisar os níveis de ROS após os bloqueios é possível observar uma influência menor de todas as vias antioxidantes analisadas na diminuição da produção de ROS em animais ateroscleróticos. Entretanto, nos animais tratados com sildenafil essa influência está aumentada (SOD: +104%; CAT: +141%; GPx: +34%), demonstrando que o sildenafil pode estar relacionado com o aumento da ação antioxidante dessas enzimas em células HSC (figura 21).



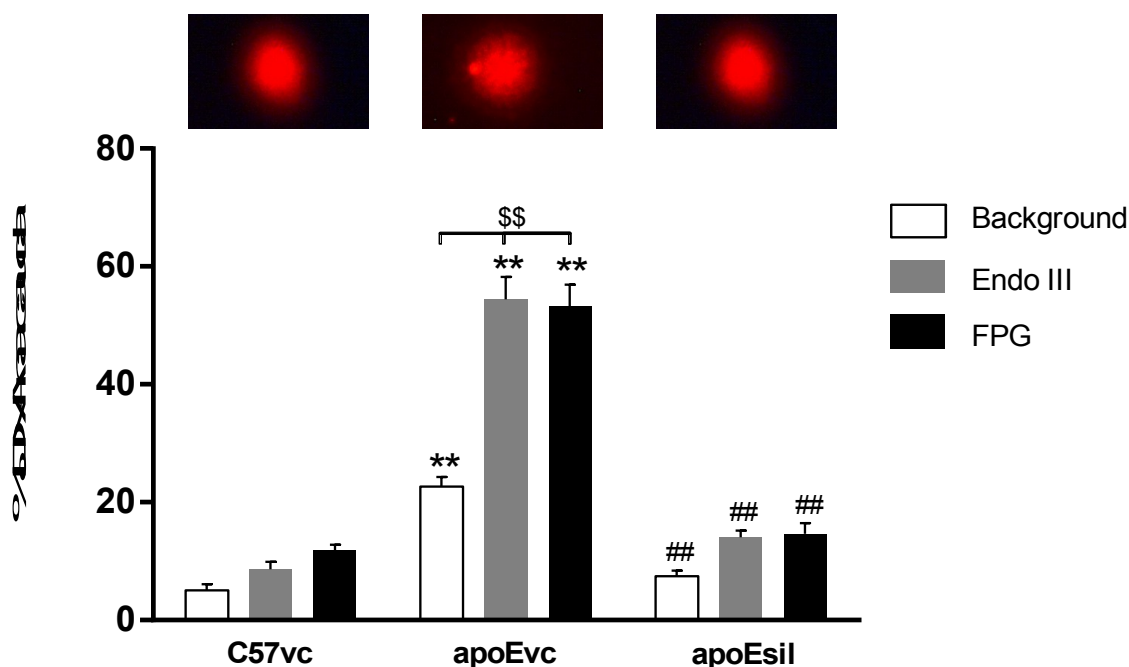
**Figura 21** – Avaliação da influência das vias antioxidantes na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil sobre essas vias em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. Os gráficos de barras mostram os efeitos dos inibidores das enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathiona peroxidase na redução de ROS. As barras não preenchidas mostram a produção basal de ROS de cada grupo e as barras preenchidas mostram após o bloqueio. Abreviações: superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Valores expressos como média±EPM, \*p<0,05 vs. C57vc; #p<0,05 vs apoEvc.

## 5.6 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE

Para avaliação da genotoxicidade foi realizado o ensaio do cometa alcalino normal e modificado, utilizando as enzimas de reparo para bases pirimídicas (Endo III) e púricas (FPG) oxidadas. Para facilitar a comparação entre estudos foi utilizado o parâmetro porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda) para essa análise, que representa o número de fragmentos de DNA que migraram durante a eletroforese.

Pode-se observar na figura 22 que os níveis de danos ao DNA em HSC nos animais apoE veículo foi maior quando comparado ao controle tanto no ensaio do cometa alcalino normal (Background: 4,4 vezes) quanto nos ensaio de dano oxidativo (Endo III: 6,3 vezes; FPG: 4,5 vezes). O tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir a genotoxicidade a níveis comparáveis ao controle em ambos os ensaios.

Assim como, pode-se observar no mesmo gráfico (figura 22) que houve um aumento significativo nos níveis de fragmentação do DNA em HSC quando utilizadas as enzimas de reparo para danos oxidativos Endo III (2,4 vezes) e FPG (2,3 vezes) comparado aos níveis observados no *background* em animais apoE veículo, demonstrando que nesses animais ocorre maior dano por oxidação do DNA, provavelmente devido ao aumento do estresse oxidativo observado durante a aterosclerose. Tanto nos animais controle quanto nos animais tratados com sildenafil não foi observada diferença significativa nos níveis de fragmentação do DNA entre os ensaios.



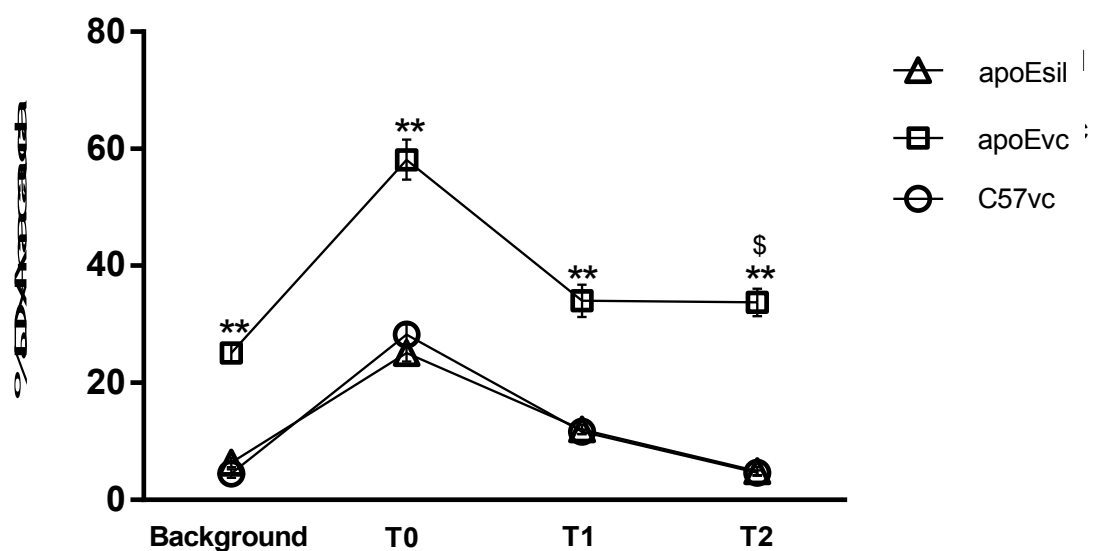
**Figura 22** – Avaliação da genotoxicidade na aterosclerose e o efeito do tratamento com sildenafil em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. As fotos demonstram cometas típicos representativos de cada grupo. O gráfico de barras mostra a porcentagem de DNA na cauda em células HSC dos diferentes grupos tanto no ensaio do cometa alcalino normal (barras não preenchidas - *background*) quanto no ensaio do cometa alcalino para danos oxidativos (barras preenchidas). Abreviações: endonuclease III (Endo III), formamidopyrimidine\_DNA-glicosilase (FPG). Valores expressos como média±EPM, \* $p < 0,05$  vs. C57vc; # $p < 0,05$  vs apoEvc; § $p < 0,05$  vs. *background*.

## 5.7 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPARO DO DNA

Para avaliação da capacidade de reparo do DNA foi realizada a análise da cinética de reparo através do ensaio do cometa alcalino modificado. Para facilitar a comparação entre estudos foi utilizado o parâmetro porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda) para essa análise, que representa o número de fragmentos de DNA que migraram durante a eletroforese.

A figura 23 mostra que os níveis de danos ao DNA em HSC nos animais apoE veículo foi maior quando comparado ao controle (Background: 5,5 vezes) e os animais tratados com sildenafil apresentaram níveis de fragmentação de DNA semelhantes aos dos animais controle.

É possível observar nesse mesmo gráfico (figura 23) que após a indução do dano ao DNA os animais apoE veículo não foram capazes de reparar completamente esse dano induzido decorrido o período de tempo máximo estabelecido (12 horas), enquanto que tanto os animais controle quanto os animais tratados com sildenafil, após a indução, foram capazes de restaurar os níveis de fragmentação do DNA aos níveis observados no *background* (12 horas de incubação). Esses resultados demonstram uma diferença na capacidade de reparo nos animais doentes, podendo ser causada pela sobrecarga do sistema de reparo do DNA devido ao aumento da genotoxicidade observados durante a aterosclerose.



**Figura 23** – Avaliação da cinética de reparo do DNA após indução ao dano oxidativo com peróxido de hidrogênio em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. O gráfico de linhas mostra a porcentagem de DNA na cauda em células HSC dos diferentes grupos no ensaio do cometa alcalino modificado para análise da capacidade de reparo do DNA. Abreviações e legendas: *Background* (nível de fragmentação do DNA antes da indução ao dano), T0 (nível de fragmentação do DNA logo após a indução ao dano), T1 (nível de fragmentação do DNA com três horas de incubação após a indução ao dano) e T2 (nível de fragmentação do DNA com doze horas de incubação após a indução ao dano). Valores expressos como média±EPM, \*p<0,05 vs. C57vc; §p<0,05 vs. *background*.

## 5.8 ANÁLISE VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR

A análise de apoptose é interessante para avaliar a influência da doença e da genotoxicidade sobre a sobrevivência das HSC no compartimento medular. Na tabela 2 é possível observar a viabilidade das células após o isolamento, demonstrando que não houve diferença entre os grupos, o que indica que o protocolo de isolamento em si não induziu à morte celular. Na mesma tabela, pode-se observar as porcentagens de HSC em apoptose após cultura celular, mostrando um maior número de células tanto em estado inicial e final de apoptose quanto em necrose nos animais apoE veículo quando comparados ao controle. O tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir o número de HSC em apoptose em ambos os estágios, como também em necrose a níveis comparáveis ao controle.

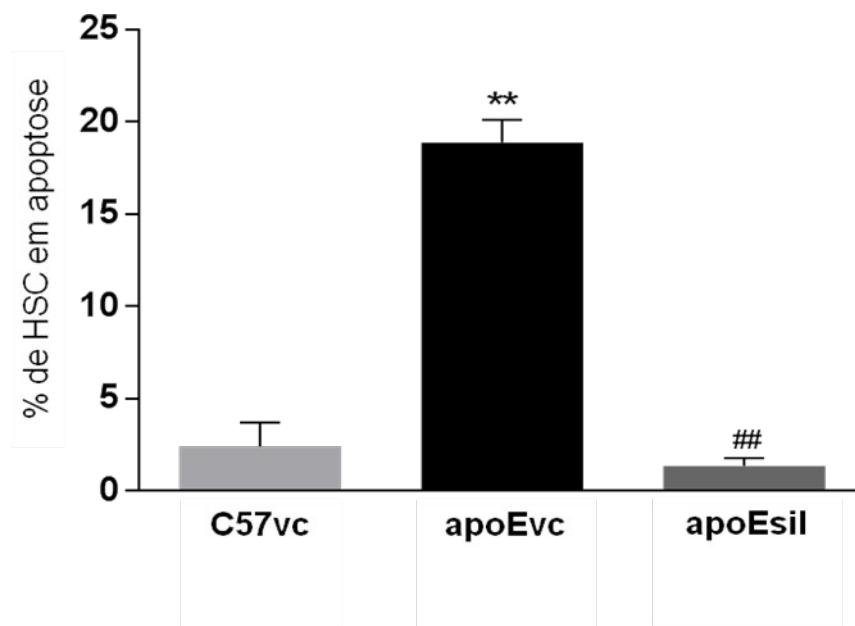
**Tabela 2:** Porcentagem média de HSC viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e necrose.

Parâmetros	Grupos		
	C57vc	apoE vc	apoE sil
Viáveis (%)	93,1 ± 1,1	94,1 ± 2,0	90,8 ± 2,4
Apoptose inicial (%)	2,0 ± 0,5	18,2 ± 0,5**	1,1 ± 0,1##
Apoptose tardia (%)	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1**	0,2 ± 0,1##
Necrose(%)	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1**	0,3 ± 0,1##

Os valores representam a média±EPM;

\*p<0,05 vs. C57vc; #p<0,05 vs apoEvc (Anova)

Na figura 24 o gráfico de barras mostra a porcentagem total de células em apoptose, indicando um maior número de HSC em apoptose nos animais apoE veículo (7,5 vezes) quando comparados ao controle. O tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir esse número a níveis menores que o controle.



**Figura 24** – Efeito da aterosclerose e do tratamento com sildenafil sobre a apoptose em células-tronco hematopoiéticas de camundongos. O gráfico de barras mostra a porcentagem total das células em apoptose detectadas por anexina V e PI. Valores expressos como média±EPM, \*p<0,05 vs. C57vc; #p<0,05 vs apoEvc.



## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a aterosclerose é uma doença que resulta de alterações lipídicas, ação de mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo (4,9,13,15). Tanto a inflamação quanto o estresse oxidativo contribuem para o dano tecidual em diversos órgãos e tecidos na aterosclerose (30). O acúmulo de LDL na matriz subendotelial é o evento primário da aterogênese e, conseqüentemente, altos níveis de LDL na circulação aceleram a progressão da doença (4,8,9). Nesse trabalho os animais apoE<sup>-/-</sup> apresentaram níveis plasmáticos de LDL colesterol cerca de 23 vezes maiores do que os animais controle.

Assim, é possível associar a hipercolesterolemia com o aumento do estresse oxidativo, já que os macrófagos são os principais produtores de ROS durante a progressão da aterosclerose, pois eles ativam o complexo enzimático oxNADPH que está presente em sua membrana plasmática e oxidam a LDL na camada íntima da parede da artéria (80). O complexo oxNADPH é composto por enzimas que catalisam a redução do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) usando NADPH como doador de elétron (81–84), e é considerado a maior fonte de  $\bullet\text{O}_2^-$  na aterosclerose (81). Além dos macrófagos os oxNADPH vasculares (isoformas encontradas na célula endotelial) também são ativadas, aumentando ainda mais a produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  (81–84). Em nosso trabalho demonstramos um aumento dos níveis  $\bullet\text{O}_2^-$  (sonda DHE) nos animais ateroscleróticos, assim como uma maior influência da oxNADPH na produção dessa ROS em HSC desses mesmos animais. Após a oxidação da LDL os macrófagos promovem apresentação de antígenos, assim os linfócitos T reconhecem a oxLDL e, liberam localmente citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, aumentando ainda mais a cascata de resposta inflamatória (9), levando assim ao aumento na produção de ROS. Em nosso estudo os animais apoE veículo apresentaram um aumento nos níveis de todas as ROS analisadas, como o ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico (NO $\bullet$ ), radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e peroxila (LOO $\bullet$ ), bem como espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), demonstrando um aumento do estresse oxidativo na aterosclerose.

Soma-se a isso, o fato de que em animais apoE<sup>-/-</sup>, devido ao processo inflamatório, ocorre a indução da xantina oxidase (XO) que está presente no endotélio e é uma enzima capaz de catalisar a oxidação da xantina e hipoxantina via O<sub>2</sub>, gerando •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e urato (85). Além disso, ocorre a indução de outros sistemas de enzimas (13), contribuindo, assim, para a formação de ROS em todas as camadas da parede arterial doente, particularmente nas placas ateroscleróticas (8,86). Foi possível observar em nosso estudo uma maior influência da XO na produção de ROS nos animais ateroscleróticos, indicando o aumento da influência dos sistemas pró-oxidantes oxNADPH e XO também em HSC, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo nesse tipo celular nos animais durante a aterosclerose. Sabe-se que em condições fisiológicas o *shear stress* e a acetilcolina, juntamente com receptores agonistas específicos, tais como trombina, bradicinina e serotonina, provocam aumento dos níveis de íons cálcio (Ca<sup>++</sup>) intracelular. Este aumento de Ca<sup>++</sup> ativa a eNOS, que atua na L-arginina (L-arg) resultando na produção de NO•. Essa reação requer a participação de co-fatores, tais como tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e NADPH, que são críticos no acoplamento da eNOS para a redução de O<sub>2</sub> e a oxidação da L-arg, resultando na produção de NO• e L-citrulina (8). No entanto, com o aumento dos níveis de ROS ocorre o desacoplamento da eNOS (34), a eNOS desacoplada passa a produzir menos NO• e aumenta a produção de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (8,9). É sabido que durante a aterosclerose ocorre um aumento compensatório na produção de NO•, o que ficou demonstrado em nossos resultados nos animais apoE veículo, no entanto nesse mesmo grupo os níveis de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> também estão aumentados, indicando, como citado nos estudos supramencionados, que pode estar ocorrendo o desacoplamento da eNOS durante a aterosclerose nesses animais, influenciando a biodisponibilidade de NO•.

Deste modo, essa superprodução de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> diminui a biodisponibilidade do NO•, pois além da eNOS desacoplada produzir menos, o NO• que é produzido pode reagir com os altos níveis de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> e formar o ONOO<sup>-</sup> (figura 23). O ONOO<sup>-</sup>, é protonado rapidamente formando o ácido peroxinitroso (HONO<sub>2</sub>). Este se decompõe rapidamente, devido a sua alta instabilidade, produzindo dióxido de

nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) (30,81–83). A formação de peroxinitrito,  $\text{HONO}_2$  e seus produtos de decomposição ( $\text{OH}\bullet$  e  $\text{NO}_2$ ) é prejudicial às macromoléculas, pois essas espécies são capazes de oxidar lipídeos, tióis e DNA (30,82,83). Assim como, esse aumento dos níveis de ROS gera uma sobrecarga dos sistemas antioxidantes, diminuindo sua capacidade e promovendo desequilíbrio entre a produção de ROS e sua degradação (75,77,87,88). Em nosso trabalho avaliamos a influência das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) na diminuição da produção de ROS, os resultados obtidos demonstraram que animais ateroscleróticos apresentam uma menor influência dessas enzimas na diminuição da produção de ROS em HSC, o que pode estar associado a sobrecarga do sistema antioxidante provocada durante o aumento do estresse oxidativo observado na aterosclerose.

Sabe-se que quando as células não respondem adequadamente a ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes (89) ocorrem danos celulares e/ou em macromoléculas através de reações químicas em cadeia, tais como a oxidação de proteínas, lipídios e DNA (9–11). Evidências sugerem que danos oxidativos ao DNA desempenham um papel importante em doenças degenerativas crônicas (90). O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Estima-se que aproximadamente  $2 \times 10^4$  lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (31,91). Desta maneira o reparo das lesões possui um papel central na prevenção do aumento de mutações nos organismos vivos (92). Os resultados observados em nosso estudo demonstraram um aumento no dano oxidativo do DNA em animais ateroscleróticos, indicando que os níveis elevados de ROS promovem um aumento da genotoxicidade em HSC nesses animais.

Parece provável que as ROS geradas por diversas rotas podem causar danos ao DNA na aterosclerose (39,40). Muitas evidências sugerem que danos cumulativos ao DNA causados pelas ROS contribuem para diversas condições clínicas (93,94) como as observadas na aterosclerose. E, por sua vez, esse acúmulo de danos pode ser influenciado pela suscetibilidade a polimorfismos

que podem alterar a atividade de genes do DNA relevantes ao reparo (40). Desta forma, na doença pode ocorrer um desequilíbrio entre a geração de danos ao DNA e seu reparo, o que leva a uma sobrecarga do sistema de reparação, promovendo acúmulo de danos que são extremamente prejudiciais ao organismo. Essa sobrecarga do sistema de reparo do DNA foi observada nos resultados referentes à cinética de reparo em nosso estudo, pois os animais apoE veículo não foram capazes de reparar o dano induzido no DNA como os animais controle. Diversas pesquisas têm avaliado danos oxidativos ao DNA a fim de testar a hipótese de que a instabilidade genômica pode ser um contribuinte significativo para a patogênese de várias doenças, inclusive a aterosclerose (39,40,95). Análises moleculares de DNA extraído a partir de placas ateroscleróticas demonstraram mutações genéticas específicas, quando comparado ao DNA de tecido normal adjacente (95–99). Trabalhos como os de Flouris *et al.* e Grati *et al.* (95,96) forneceram informações sobre genes suscetíveis a alterações moleculares relacionados à aterosclerose.

A disfunção endotelial e o acúmulo de oxLDL promovem uma resposta vascular inflamatória e a produção de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de CML (4,17). Portanto, a placa aterosclerótica é um meio provedor de um processo inflamatório crônico que libera uma variedade de mutagênicos endógenos, tais como as ROS, que podem contribuir diretamente para as modificações no DNA (40). Trabalhos recentes em nosso laboratório mostraram a relação entre o aumento do estresse oxidativo e, consequente, elevação do dano ao DNA. Campagnaro *et al.* mostraram um aumento na fragmentação do DNA associado ao aumento da geração de  $\bullet\text{O}_2^-$  em células da medula óssea de camundongos com hipertensão renovascular (76). Bem como, os trabalhos de Dalboni *et al.* e Tonini *et al.* relacionaram o dano ao DNA, respectivamente, em células sanguíneas e células MNC da medula óssea de camundongos apoE<sup>-/-</sup> com o envelhecimento, a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo (75,77), mostrando uma correlação entre aterosclerose, estresse oxidativo e dano ao DNA.

Estudos indicam um importante papel da apoptose no ateroma humano avançado, fornecendo evidências específicas que a morte celular por apoptose

está fortemente relacionada com o grau de desenvolvimento da placa aterosclerótica (100–102). Esta observação poderia ser a consequência de um grau mais grave de danos ao DNA em placas ateroscleróticas avançadas, já que tanto os macrófagos quanto as CML sofrem apoptose na placa aterosclerótica (100). Em nosso estudo os animais ateroscleróticos apresentaram um número aumentado de HSC em apoptose quando comparados ao controle, mostrando uma influência dos altos níveis de ROS e da genotoxicidade também nesse tipo celular durante a aterosclerose.

Estudos já demonstraram que a hipercolesterolemia ajuda a promover a inflamação e reforçar a iniciação e progressão da aterosclerose. No entanto, estudos recentes têm relatado que a hipercolesterolemia tem um impacto nas HSC e na medula óssea (MO), fortalecendo a inflamação nesse local (103). Na MO as HSC permanecem quiescente por residir em um nicho hipóxico, com produção de ROS limitada (104). O microambiente hipóxico é favorável para manter a capacidade de auto-renovação e função das HSC (KHATRI et al., 2016).

Apesar das HSC representarem uma população pequena, cerca de 0,001% das células na MO, elas desempenham o papel essencial de uma célula-tronco: capacidade de auto-renovação na geração de células progenitoras e precursoras e capacidade de dar origem a todos os tipos de células sanguíneas ao longo da vida. A transição da quiescência para estágios de ativação e mobilização de HSC da MO para o sangue, são altamente organizadas por fatores intrínsecos, fatores extrínsecos, receptores nas HSC e células circundantes no nicho. Alguns dos estímulos para essa ativação incluem infecção bacteriana crônica (107,108), estresse psicossocial (109), lesão, como infarto do miocárdio (110) e hipercolesterolemia (111–114). Assim, a ativação e retenção das HSC em sua maior parte são moduladas pelo nicho da MO onde essas células estão localizadas. As funções de apoio desse nicho sobre as HSC são: (1) as células do estroma da MO e os macrófagos que podem produzir citocinas hematopoiéticas, como a trombopoietina (TPO) (115), fator de células-tronco (c-kit ligante) (116) e fatores de estimulação de colônias de granulócitos (117,118) para apoiar a hematopoiese; (2) as células

endoteliais que preservam a vasculatura e interagem com as HSC através do eixo Tie2/angiopoietina-1, proteínas semelhantes à angiopoietina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na sinalização para auxiliar a regeneração mediada por HSC (106,119–121); (3) a retenção das HSC no nicho medular é mediada por sua interação com células endoteliais e células estromais através de integrinas e quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4)/fator derivado do estroma-1 (SDF-1) (122,123). Assim, não é surpreendente que a perturbação da estabilidade do nicho medular poderia alterar substancialmente o destino das HSC.

A hipercolesterolemia, incluindo altos níveis de LDL colesterol, estimula a produção de ROS por células endoteliais e células mieloides (124), proporcionando um microambiente oxidativo para as HSC, o que pode contribuir para acelerar sua expansão. Assim, esses dados indicam que ROS poderiam ser reguladoras independentes para a proliferação e diferenciação de HSC. Existe uma forte ligação entre hipercolesterolemia, expansão de HSC, inflamação e aterosclerose. Embora as HSC residam na MO, uma minoria dessas células trafegam entre a MO e o sangue e, são capazes de chegar a tecidos onde se tornarão células residentes para defesa imunológica (125,126). Portanto, algumas questões são importantes de serem abordadas: poderia as HSC derivadas da MO participarem diretamente da aterosclerose? Qual o impacto da hipercolesterolemia/aterosclerose na função das HSC?

Alguns estudos demonstraram que animais hipercolesterolêmicos são capazes de recrutar as HSC para o local de lesão aterosclerótica (127). Assim, é possível pensar que a hipercolesterolemia poderia modificar a mobilidade dessas células e aumentar a atividade de recrutamento para contribuir com a aterosclerose. É bem sabido que o microambiente medular desempenha um papel fundamental na proteção das HSC de agentes citotóxicos e subprodutos metabólicos, mantendo essas células quiescentes (128). Assim, a compreensão do nicho medular em um estado patológico (como a aterosclerose) e sua influência sobre o potencial dessas células pode deter a chave para o desenvolvimento de uma terapia eficaz.

Evidências crescentes mostram que em mamíferos o acúmulo intracelular de ROS leva a danos/desregulação de tecidos, inclusive na MO (129). Foi demonstrado que níveis elevados de ROS podem comprometer o mecanismo de reparo do DNA e contribuir para o comprometimento do nicho medular em anemia de Fanconi (130), no envelhecimento (131), na aterosclerose (77), na hipertensão renovascular (76). Para se protegerem, as células desenvolvem inúmeros sistemas de defesa antioxidante tais como sistemas enzimáticos, sistemas não enzimáticos e vitaminas (132). O aumento do estresse oxidativo mostrou ter um papel negativo na regeneração da medula, e a superexpressão de enzimas antioxidantes melhoram a capacidade de regeneração das HSC em camundongos (133). Em nosso trabalho ficou demonstrado o aumento do estresse oxidativo em HSC da MO na aterosclerose, o que pode ter levado a um comprometimento do microambiente medular, perturbando, também, as células estromais, que são componentes vitais para regulação do nicho das células-tronco. Assim, esses altos níveis de ROS levaram a um aumento da instabilidade do DNA em HSC nos animais ateroscleróticos, o que pode ser adicionado como um fator importante na aterosclerose, que é uma doença multifatorial. Tendo um papel importante como fator patogênico e no prognóstico da doença, demonstrando uma dimensão biológica antes ignorada dentre os fatores de risco, levando a novos potenciais alvos terapêuticos.

Portanto, devido ao impacto da elevada produção de ROS, aumento da capacidade oxidante, diminuição da capacidade antioxidante, e, conseqüentemente, do aumento do dano ao DNA observado na aterosclerose a inibição da fragmentação do DNA via oxidação é um ponto interessante que deve ser avaliado ao se testar a eficácia de novas terapias para a prevenção do desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Logo, a utilização de fármacos com propriedades antioxidantes pode ser uma opção no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo para amenizar os danos ao material genético. O sildenafil, como já mencionado, aumenta o GMPc intracelular através da inibição da enzima PDE5. Em nosso estudo tratamos os animais apoE com sildenafil observando pesquisas anteriores que demonstraram o efeito antioxidante dessa droga.

Pesquisas mostraram que o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a expressão da oxNADPH e a formação de  $\bullet\text{O}_2^-$  em cultura de células de coelhos hipercolesterolêmicos (134) e porcos (58), bem como em aorta de ratos diabéticos (57). Em nossos resultados observamos uma diminuição da influência na produção de ROS via oxNADPH e XO nos animais ateroscleróticos tratados com sildenafil. Bivalacqua *et al.* (54) demonstraram que o sildenafil diminuiu a sinalização de ROS, os níveis de  $\text{ONOO}^-$  e a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em ratos e isso se deve a uma ação direta do aumento da atividade da eNOS e da diminuição dos níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Nosso trabalho mostrou que o estresse oxidativo foi reduzido a níveis semelhantes ao controle nos animais tratados com sildenafil.

Assim como, Beheshtian *et al.* (51) demonstraram que o sildenafil aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT em ratos. Além disso, também foi demonstrado que a capacidade antioxidante total do plasma foi aumentada com o uso de sildenafil em ratos diabéticos (29) e que o sildenafil aumentou a atividade da CAT, GPx e SOD em corações de ratos diabéticos (47). Esses dados corroboram nossos resultados que mostraram que o tratamento com sildenafil proporciona uma influência maior da capacidade antioxidante das enzimas citadas na diminuição da produção de ROS também nas HSC dos animais ateroscleróticos tratados.

Trabalhos recentes em nosso laboratório demonstraram que o sildenafil é capaz de reduzir os níveis de ROS em camundongos  $\text{apoE}^{-/-}$  e diminuir os níveis de danos ao DNA em diversas células e tecidos desses animais (53,59,60). Em nosso estudo ficou demonstrado que o tratamento com o sildenafil foi capaz de diminuir os níveis de dano oxidativo ao DNA nos camundongos  $\text{apoE}^{-/-}$  alcançando os níveis dos animais controle. Assim como, a capacidade de reparo do DNA avaliada pela análise da cinética de reparo nesses animais mostrou que o tratamento com sildenafil melhorou a resposta de reparação ao DNA a níveis semelhantes ao do controle.

Portanto, nosso trabalho conseguiu demonstrar que o tratamento com um agente antioxidante, como o sildenafil, pode melhorar as alterações causadas



pela aterosclerose associadas com danos oxidativos em HSC. Nosso estudo claramente indicou o papel do sildenafil na redução do estresse oxidativo em HSC da MO, diminuindo a influência dos sistemas pró-oxidantes, aumentando a influência das enzimas antioxidantes. Assim, proporcionando a diminuição dos níveis de fragmentação do DNA, aumentando a capacidade do sistema de reparo do DNA e diminuindo o níveis de apoptose nessas células em camundongos apoE<sup>-/-</sup>. Essas propriedades antioxidantes do sildenafil supramencionadas podem constituir um mecanismo-chave para a redução do estresse oxidativo, genotoxicidade e apoptose em HSC na aterosclerose e estabilização do microambiente medular durante a doença.

## **7. CONCLUSÃO**

Sabe-se que as HSC são extremamente importantes para a manutenção da homeostase do organismo. E que sua ativação e retenção são finamente reguladas pelo nicho medular que as comportam. No entanto, este estudo propõe que o aumento dos níveis de ROS, genotoxicidade e apoptose durante a aterosclerose em HSC da MO podem levar à perturbação do nicho medular e

de seus componentes, sendo também um fator importante na patogênese da doença.

O tratamento com um agente antioxidante, como o sildenafil, pode superar, em parte, alguns desses problemas associados à aterosclerose. Assim, foi possível observar nesse estudo que o tratamento proporcionou a diminuição dos níveis de ROS, diminuição da influência de sistemas pró-oxidantes como oxNADPH e XO e aumento da influência da capacidade antioxidante (SOD, CAT e GPx) com, conseqüente, diminuição do estresse oxidativo em HSC da MO.

Assim como, este estudo confirma que o sildenafil foi capaz de diminuir a genotoxicidade causada por ROS e aumentar a capacidade de reparo do DNA em HSC dos animais ateroscleróticos, proporcionando também uma diminuição no número de células apoptóticas nesses animais.

À vista disso, pode-se dizer que o sildenafil constitui uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da aterosclerose, podendo contribuir para a estabilização do nicho medular, importante regulador do funcionamento das células-tronco adultas e, conseqüentemente da plasticidade do organismo. Bem como, diminuir o estresse oxidativo, genotoxicidade e apoptose em HSC, podendo ocasionar um aumento da eficiência dessas células.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 9 ANEXO

### Artigo para submissão

#### **Accelerated liver aging in atherosclerotic animals: focus in lipid deposition, oxidative stress and apoptosis**

Bianca P. Rodrigues<sup>1</sup>, Marcella L. Porto<sup>1,3</sup>, Ananda T. Dias<sup>1</sup>, Tadeu E.C. Zanardo<sup>4</sup>, Geisiane Bezerra<sup>1</sup>, Alyne M. M. Ton<sup>2</sup>, Bianca P. Campagnaro<sup>1,2</sup>, Breno V. Nogueira<sup>4</sup>, Thiago M.C. Pereira<sup>2,3</sup>, Agata L. Gava<sup>1</sup>, Silvana S. Meyrelles<sup>1</sup> and Elisardo C. Vasquez<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29043-900, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Translational Physiology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, ES 29102-770, Brazil;

<sup>3</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology, Vila Velha, ES 29106-010, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29042-755 Brazil

\* Corresponding author

Elisardo Corral Vasquez

Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29043-900, Brazil;

e-mail: [evasquez@terra.com.br](mailto:evasquez@terra.com.br)

## **Abstract**

Although exists an association between atherosclerosis, liver lipid deposition and aging, direct relationships between them is not completely investigate. In the present study, we evaluated the influence of these three factors in the apolipoprotein E knockout (apoE) mouse, an animal model of spontaneous atherosclerosis. The livers from young, middle age and aged apoE mice were subjected to analysis of lipid deposition, liver intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptosis, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) and glutamic-oxaloacetic (GOT) and glutamic pyruvic (GPT) transaminases, compared with age-matched wild-type (C57) mice. Liver from young apoE mice exhibited lipid deposition and an augmented cell production of ROS: superoxide anions (2.1-fold), peroxynitrite (1.9-fold), hydrogen peroxide (1.7-fold) and AOPP (4.6-fold), compared with age-matched C57 mice. Levels of plasma transaminases were significantly higher in apoE mice (GOT: 3.1-fold and GPT: 2.1-fold) than in C57. ApoE mice also exhibited higher number of apoptotic liver cells (2.5-fold) than C57 animals. In elderly apoE mice, all these parameters were worsened, while C57 mice showed only an increased ROS production and apoptosis. In conclusion, both aging process and hypercholesterolemia can lead to liver damage and dysfunction and that the elderly apoE mouse is a suitable model for studying the relationship between lipid disorders and liver dysfunction.

**Keywords:** Aging; apolipoprotein E; oxidative stress; apoptosis; liver

## **Background**

Atherosclerosis is a complex and progressive disease involving lipid disorders, inflammation and enhanced oxidative stress in conductance arterial wall vessels [1–3]. At cellular level, the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses is directly linked to cell senescence, apoptosis, DNA damage and mitochondrial dysfunction [3–6]. In addition to vascular disorders, the association of increased ROS production and apoptosis in an age-dependent manner has been demonstrated in several cell types, such as those

from the whole blood, bone marrow mononuclear cells, hematopoietic stem cells and hepatic cells [5,7–10].

The liver is the central metabolic organ regulating several key aspects of protein, carbohydrate and lipid metabolism in response to nutritional and hormonal signals [11–13]. Although there is a growing research about the deleterious effects of increased oxidative stress to different organs and tissues suffering from dyslipidemias [5,8,13–16], the involvement of the liver on this process has not yet been completely clarified.

One of the most common experimental models to study diseases related with atherosclerosis is the apolipoprotein E knockout (apoE<sup>-/-</sup>) mouse [3,17]. Although some studies have demonstrated that the liver exhibits age-related enzymatic and structural alterations, increases in lipofuscin and proinflammatory cytokines in this murine model of spontaneous atherosclerosis [5,8,15,16,18], some important questions still need to be answered. Therefore, the aim of the present investigation was to evaluate the temporal mechanisms of morphological and functional changes as consequence of augmented oxidative stress in the hepatic disease in the apoE<sup>-/-</sup> mouse.

## **Methods**

### **Animals**

Experiments were performed in young, middle age and aged (2, 12 and 24-month-old, respectively) male wild-type C57BL/6J (C57) and apoE<sup>-/-</sup>, that were bred and maintained in the Laboratory of Translational Physiology animal facilities (Vitoria, ES, Brazil). The mice were fed a standard chow diet and provided water *ad libitum*. Animals were housed in individual plastic cages with controlled temperature (22 °C) and humidity (60%) and were exposed to a 12/12 h light-dark cycle. Mice were euthanized with sodium thiopental overdose (100 mg/kg, intraperitoneal injection). Care and use of laboratory animals were in accordance with National Institutes of Health guidelines. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research, as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology, and were approved by the

Institutional Ethics Committee - Emescam College of Health Sciences (CEUA-EMESCAM 014).

### **Samples**

Animals were euthanized and a thoracic incision was performed for blood collection through intra-cardiac puncture. Blood was immediately transferred to a tube containing EDTA and centrifuged at 600 *g* for 10 min in order to separate the plasma for a subsequent biochemical analysis.

Liver cells enriched fractions from mice of different groups were prepared as previously reported by our laboratory [12]. Briefly, the left lobe of the liver was grossly triturated with surgical scissors and incubated with collagenase type II (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to dissociate the cells. Then, the cell extract was filtered through a nylon screen (BD falcon 70  $\mu$ m) to remove cell debris. Furthermore, the samples were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) to remove the enzymes. The samples were stored at -80°C until further analysis. All liver cells samples showed 80–90% viability in trypan blue exclusion test.

### **Biochemical analysis**

Total plasma cholesterol, glutamic-oxaloacetic (GOT) and glutamic pyruvic (GPT) transaminases were determined using commercial colorimetric assay kits (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), following the instructions of the manufacturer.

### **Histological analysis**

For the histological analysis, the liver was perfused with 0.1 M PBS, pH 7.4, followed by a 4% formaldehyde solution at a pressure of 100 mmHg. The liver was embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound and cross-sectioned on a cryostat (Jung CM1800; Leica, Wetzlar, Germany) at a thickness of 10  $\mu$ m. For each animal, liver cross-sections were mounted on gelatin-coated slides and stained with Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to detect neutral lipids.

### **AOPP determination**

We used the advanced oxidation protein products (AOPP) assay protocol to evaluate the oxidation of proteins. Briefly, a sample of 40  $\mu\text{L}$  of plasma was diluted with 1:5 PBS; 10  $\mu\text{L}$  of KI and 20  $\mu\text{L}$  of acetic acid were then added to each sample, which was vortexed and measured in nanodrop at an absorbance of 340 nm and compared with a PBS as a control. The chloramine-T absorbance at 340 nm was linear within the range of 0 to 100  $\mu\text{M}$ . The concentrations were expressed in  $\mu\text{mol/L/mg}$  of total protein and were previously quantified using the standard Bradford method.

### **Measurement of Reactive Oxygen Species**

Liver cells ROS analysis was performed by flow cytometry as previously described [5]. Dihydroethidium (DHE, 160  $\mu\text{M}$ ) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF, 20 mM) were added to the cell suspension ( $10^6$  cells) and incubated at 37 °C for 30 min in the dark to estimate the intracellular superoxide ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) or hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentration, respectively. The measurement of nitric oxide (NO) was performed with the NO-sensitive fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF, 2  $\mu\text{M}$ ) that was added to cell suspension ( $10^6$  cells) and incubated at 37 °C for 180 min in the dark. Highly reactive oxygen species (hROS), such as hydroxyl radical and peroxynitrite, were selectively detected by 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3Hxanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (HPF). The cells were then washed, resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry (FACSCanto II). The data were acquired using the FACSDiva software (BD) and overlay histograms were analyzed using FCS Express software trial (De Novo). For the quantification of DHE, DCF, DAF and HPF fluorescence, the samples were acquired in duplicate and 10,000 events were used for each measurement. The cells were excited at 488 nm; DHE fluorescence was detected using a 585/42 bandpass filter, and DCF/DAF/HPF fluorescence was detected using a 530/30 bandpass filter. The data are expressed as the median fluorescence intensity (MFI).

### **Determination of apoptosis**

Apoptotic liver cells were quantified by annexin V-FITC and propidium iodide (PI) double staining using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD). In brief, the cells were washed twice with PBS and adjusted to 500  $\mu$ L in binding buffer ( $5 \times 10^5$  cells). Then, annexin V-FITC and PI were added to cell suspension, and the cells were gently vortexed. The cells were then incubated for 15 min at room temperature (25 °C) in the dark. Finally, the cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCanto II (BD).

### **Statistical analysis**

All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The normality (Gaussian distribution) of the variables was previously analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test. The statistical analysis was performed using the two-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA showed significant differences, the Bonferroni's test was performed as a *post hoc* analysis. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

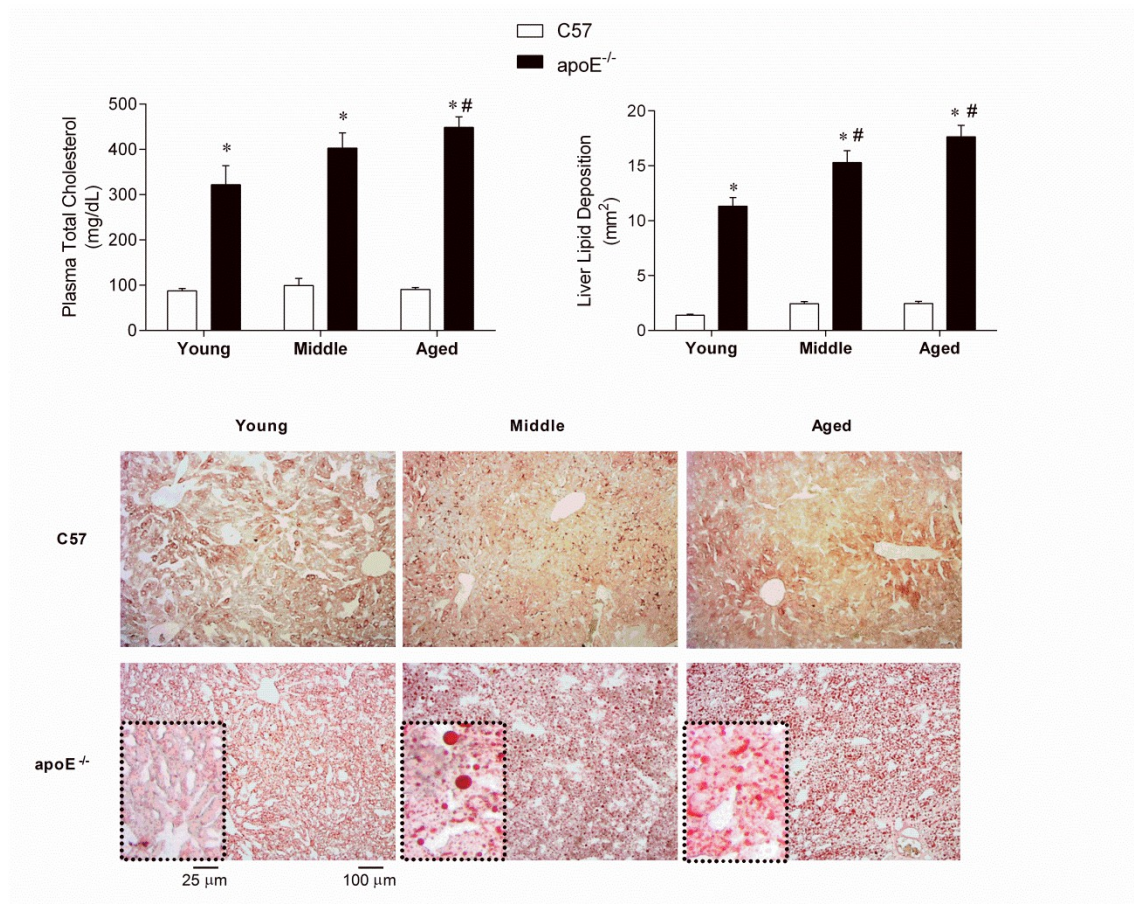
### **Results**

#### **Plasma total cholesterol level and liver lipid deposition**

As expected, plasma total cholesterol was higher in apoE<sup>-/-</sup> than C57 mice, at all ages. Interestingly, while the aging process did not cause significant effects on cholesterol levels in C57 mice, in apoE<sup>-/-</sup> group (Figure 1, left) there was an increase in this parameter during the aging process (young: 3.6-fold; middle: 4.0-fold; aged: 3.9-fold;  $p < 0.01$ ).

Hepatic steatosis is a common histological finding in chronic liver diseases. Figure 1 (bottom) show representative images of lipid deposition detected with oil-red-O staining in the liver. It is clearly noted a great number of positive staining for lipids in the liver of apoE<sup>-/-</sup> mice compared with C57 animals (young: 8.0-fold; middle: 6.3-fold; aged: 7.3-fold;  $p < 0.05$ ). The oil-red-O staining did not show important lipid deposition in the C57 animals (averaging  $2.0 \pm 0.2$  mm<sup>2</sup>), in contrast with apoE<sup>-/-</sup> mice, which showed high levels at young age ( $11.3 \pm 0.2$  mm<sup>2</sup>) and increased with aging process. As shown in Figure 1 (right panel), the lipid deposition in apoE<sup>-/-</sup> mice significantly increased with aging (young x middle: 1.3-fold,  $p < 0.05$ ; young x aged: 1.5-fold,  $p < 0.05$ ). This finding indicates that the atherosclerotic disease in this experimental model was associated with hepatic steatosis.

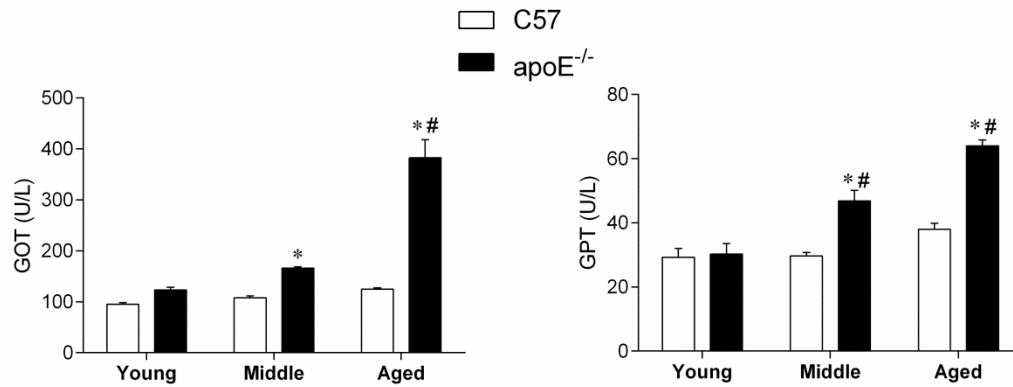




**Figure 1.** Plasma total cholesterol levels (left bar graph) and liver lipid deposition (right bar graph) in apoE<sup>-/-</sup> compared with control C57 mice. Images are typical liver cross-sections photomicrographs staining with oil-red-O in apoE<sup>-/-</sup> and C57 mice at different ages. Lower magnification: x4; bar at higher magnification: 100 μm). The values are presented as means ± SEM, \*p < 0.05 vs. C57. #p < 0.05 vs. younger apoE<sup>-/-</sup>.

### GOT and GPT plasma levels

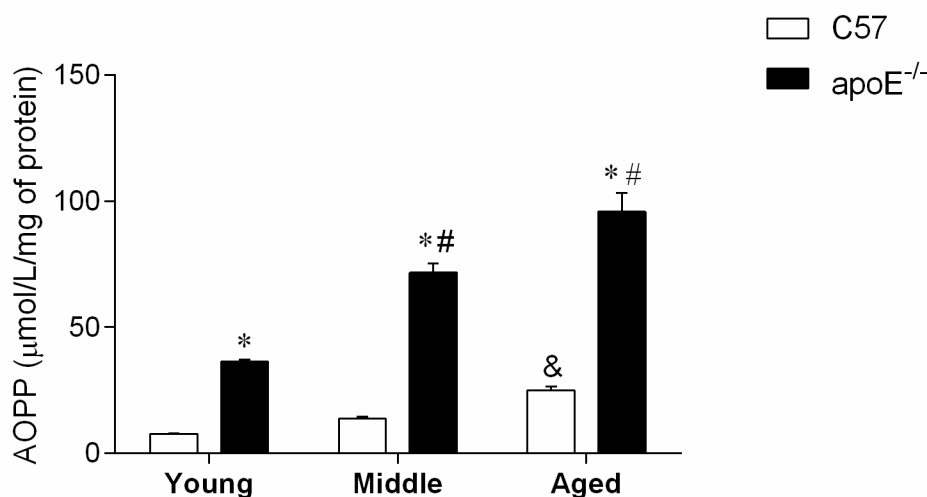
Figure 2 shows average plasma levels of hepatic transaminases GOT (left bar graph) and GPT (right bar graph). The data clearly demonstrated an age-related increase in the GOT (3.1-fold, p<0.05) and GPT (2.1-fold, p<0.05) levels in apoE<sup>-/-</sup> mice, but just a trend towards an upward shift in older control animals. However, a significant increase of both transaminases plasma levels was observed in middle age apoE<sup>-/-</sup> mice (1.5-fold and 1.6-fold, respectively) and this condition was significantly worsened in aged animals (3.0-fold and 1.7-fold, respectively).



**Figure 2.** Bar graphs are average plasma levels of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) (left bar graph) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) (right bar graph). The values are presented as means  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. C57. # $p < 0.05$  vs. young and middle aged apoE<sup>-/-</sup>.

### Advanced oxidation protein products determination

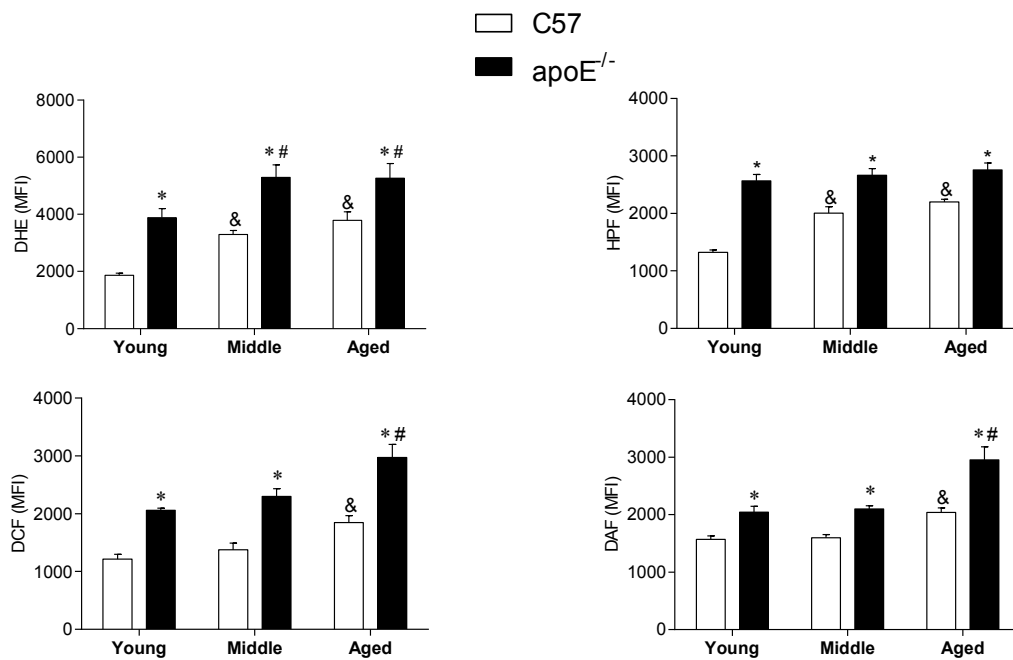
As observed in Figure 3, plasma levels of AOPP, a method used as an indicator of oxidized proteins, was remarkable increased in all ages of apoE<sup>-/-</sup> group, but the C57 group exhibited just an increase just in aged group. In apoE<sup>-/-</sup> mice the AOPP levels were significantly higher than in C57 (young: 4.6-fold; middle: 5.2-fold; aged: 3.8-fold;  $p < 0.05$ ) and values were gradually increased in middle (1.9-fold) and aged (2.6-fold) when compared with young apoE<sup>-/-</sup> mice.



**Figure 3.** Biomarker of advanced oxidation protein products (AOPP) in blood plasma and its correlation with the aging process in apoE<sup>-/-</sup> compared with C57 mice. The values are presented as means  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. C57. # $p < 0.05$  vs. younger groups of apoE. & $p < 0.05$  vs. younger groups of C57

## ROS production

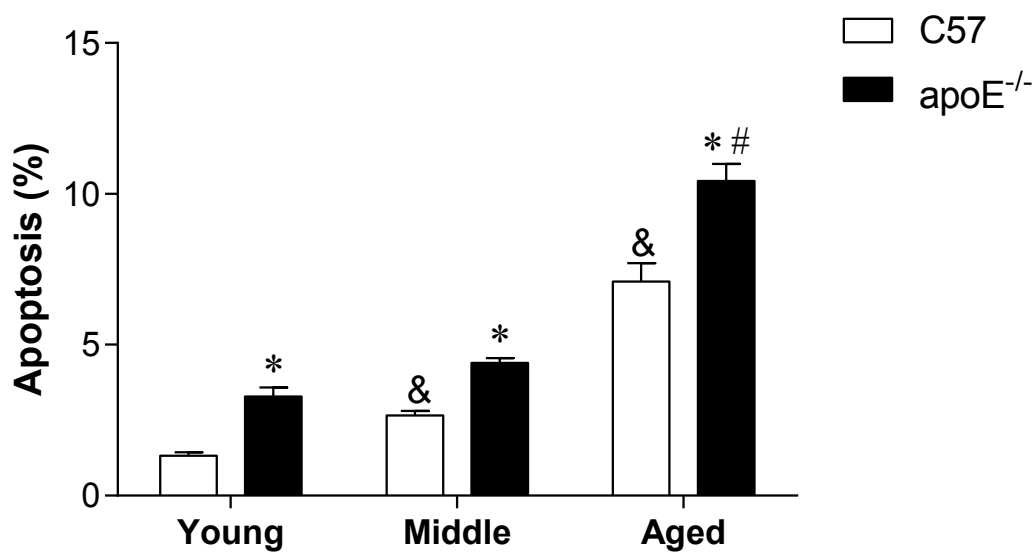
Intracellular levels of ROS were evaluated in liver cells from apoE<sup>-/-</sup> and C57 at the three target ages. Figure 3 shows the averaging values of biomarkers of ROS. In young animals, it was observed significant higher values of superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ , Figure 4 top left, DHE, 2.1-fold), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Figure 4 bottom left, DCF, 1.7-fold), peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) (Figure 4, top right, HPF, 1.9-fold) and nitric oxide (NO) (Figure 4 bottom right, DAF, 1.3-fold) in apoE<sup>-/-</sup> mice. Similar differences between groups of apoE<sup>-/-</sup> and C57 were observed in older (middle and aged). These data corroborate our initial hypothesis that aging *per se* has a significant influence on the aggravation of oxidative stress in hepatic cells, with exception of hyperreactive ROS.



**Figure 4.** Relative contribution of intracellular ROS generation pathways in liver cells from control C57 and atherosclerotic apoE<sup>-/-</sup> mice. ROS production was assessed by DHE (superoxide anion), DCF (hydrogen peroxide), DAF (nitric oxide) and HPF (peroxynitrite) staining. Bar graphs show the average median fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  SEM, which was used to quantify the respective ROS measured by flow cytometry. \*p < 0.05 vs. C57. #p < 0.05 vs. younger apoE<sup>-/-</sup> &p < 0.05 vs younger C57.

## Apoptosis levels

Apoptosis and cell viability were analyzed in the liver of apoE<sup>-/-</sup> and C57 mice. As shown by data in Figure 5, young apoE<sup>-/-</sup> mice exhibited significantly greater percentage of apoptotic liver cells (2.5-fold,  $p < 0.05$ ) than C57 animals, indicating that deletion of ApoE *per se* is early associated with occurrence of inviable liver cells. The aging process increased the number of apoptotic cells in both C57 mice (1.3%, 2.7% and 7.1%, respectively,  $p < 0.05$ ) and age-matched apoE<sup>-/-</sup> animals (3.3%, 4.4% and 10.3%, respectively,  $p < 0.05$ ). It means that the aging process contributes to apoptosis in both C57 (~5-fold) and aggravates (3-fold) the pre-apoptotic process (~2.5-fold) in apoE<sup>-/-</sup> animals.



**Figure 5.** The apoptosis levels in liver cells during aging and disease. Bar graph shows average percentage of apoptotic cells measured by flow cytometry comparing apoE<sup>-/-</sup> and C57 animals. \* $p < 0.05$  vs. C57. # $p < 0.05$  vs. younger apoE<sup>-/-</sup> & $p < 0.05$  vs younger C57.

## Discussion

In dyslipidemic apoE<sup>-/-</sup> mouse model there is some evidence that the inflammation extends beyond atherosclerotic plaques to visceral adipose tissue [19], brain [20], pancreas [21], kidney [22] and liver [12,13]. However, the relationship with aging still needs to be more clarified. In the present study, we evaluated the consequences of the concurrence of atherosclerotic disease and aging to the liver in apoE<sup>-/-</sup> mice, in comparison with non-atherosclerotic aged mice. The novelty of the present study is the demonstration of aging-dependent

deleterious changes in the liver of apoE<sup>-/-</sup> mice, including a markedly hepatic lipid deposition, increased biomarkers of oxidative stress and apoptosis.

Although it is well established that ROS are continuously produced in most cells, when produced at high abnormal levels, they can lead to irreversible damage of macromolecules (e.g. lipids, proteins and DNA) , resulting in apoptosis, as has been observed in different tissues of the cardiovascular and metabolic diseases[5,10,12,13,23,24]. Our data expanded those previous studies, by demonstrating through direct and indirect methods, an increase of oxidized proteins in the plasma and high levels of •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, •ONOO<sup>-</sup> and •OH<sup>-</sup> in the liver cells. Moreover, here we demonstrated a close association between augmented ROS production and apoptosis in the liver of apoE<sup>-/-</sup> mice. These data corroborate the findings published by Bonomini et al., [13] who reported down regulation of NAD<sup>+</sup>- dependent deacetylase (SIRT1) an inactivator of p53, leading to ROS generation and apoptosis [25,26].

In addition, our histological analysis showed an increase in lipid deposition area in middle and aged apoE<sup>-/-</sup> mice compared with young apoE<sup>-/-</sup>, demonstrating an important age-related hepatic steatosis. The above results are in agreement with previous studies showing the association of aging with lipid deposition in the apoE<sup>-/-</sup> mouse in many tissues [5,13,27]. The aging process in atherosclerotic mice have been evaluated at ages of 12 and 15 months [5,13]. The importance of the present study is that we evaluated the old animals at 24 months, which in our opinion appears more consistent with the lifespan of this murine model.

There are some reporters showing that the aging process also results in important metabolic and cardiovascular abnormalities in both normal [28] and models of atherosclerosis [5,8] and cardiovascular diseases [4,9]. The present study contributes to this scenario with the finding that the aging process *per se* leads to apoptosis in the liver of control mice and that this abnormal occurrence is aggravated by the concurrence of hypocholesteremia. The data support the idea that hypercholesterolemia and aging additively contribute to oxidative stress in liver cells, leading to deleterious effects, such as increase in apoptosis

[5,8,12,24] and increment of serum transaminases. These data could indicate that apoE<sup>-/-</sup> mice could be more susceptible to developing severe liver injury and suggest that in addition to vascular disease, increased cholesterol products and oxidative stress may also play a role in damaging the liver [7,8,13]. At the same time, it has also been shown that liver disease is an important factor for the progression of cardiovascular diseases [29], resulting in a vicious cycle in the course of aging.

Therefore, the apoE<sup>-/-</sup> mouse is a suitable model to a better understanding of age-related changes in liver cells associated with hypercholesterolemia and may be a helpful tool to investigate mechanisms underlying aging-related chronic degenerative disorders. This study is in agreement with another studies that showed that hypercholesterolemia and aging can trigger the increase in ROS production, DNA damage, senescence and apoptosis in several cell types [5,8,13,18,24].

## **Conclusions**

In this study, we used the apoE<sup>-/-</sup> mouse model of spontaneous atherosclerosis to evaluate the relative contribution of hypercholesterolemia and aging to the damage of the liver, which is considered the main organ of lipid metabolism. The liver from animals with high levels of plasma cholesterol exhibited lipid deposition, augmented ROS production, apoptosis and high levels of biomarkers (GOT and GPT) of liver function, and these disturbances were worsened by the aging process. In contrast, in old wild-type mice, the changes were smaller and restricted to increase of oxidative stress and apoptosis. Therefore, the initial systemic inflammatory cascade observed in atherosclerosis, is aggravated by the aging process, resulting in hepatic lipid deposition and increased ROS, and culminating in hepatic steatosis and apoptosis. Therefore, apoE<sup>-/-</sup> is a suitable experimental model for the understanding of mechanisms underlying age- and dyslipidemia-related liver disorders and degeneration. Despite the comparable clinicopathological characteristics of steatosis observed in this model, one could not fully extrapolate the present conclusion to the clinic.

## Conflict of interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## References

1. R. Ross, "Atherosclerosis - An Inflammatory Disease, ". *New England Journal Medicine*, vol. 340, pp. 115–126, 1999.
2. L. C. F. Lima, M. L. Porto, B. P. Campagnaro et al., "Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Lipids in Health and Disease*, vol. 11, pp. 96, 2012.
3. E. C. Vasquez, V. A. Peotta, A. L. Gava, T. M. C. Pereira, S. S. Meyrelles, "Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse," *Journal of Biomedical Science*, vol. 19, pp. 22, 2012.
4. S. S. Meyrelles, V. A. Peotta, T. M. C. Pereira, E. C. Vasquez, "Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging," *Lipids in Health and Disease*, vol. 10, pp. 211, 2011.
5. C. L. Tonini, B. P. Campagnaro, L. P. S. Louro, T. M. C. Pereira, E. C. Vasquez, S. S. Meyrelles, "Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, pp. 3325-3342, 2013.
6. I. A. Sobenin, A. V. Zhelankin, V. V. Sinyov, Y. V. Bobryshev, A. N. Orekhov, "Mitochondrial Aging: Focus on Mitochondrial DNA Damage in Atherosclerosis - A Mini-Review," *Gerontology*, vol. 61, pp. 343-349, 2015.
7. J. K. Folkmann, L. Risom, C. S. Hansen, S. Loft, P. Møller, "Oxidatively damaged DNA and inflammation in the liver of dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> mice exposed to diesel exhaust particles," *Toxicology*, vol. 237, pp. 134–144, 2007.
8. J. K. Folkmann, S. Loft, P. Møller, "Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice," *Mutagenesis*, vol. 22, pp. 105–

110, 2007.

9. B. P. Campagnaro, C. L. Tonini, B. V. Nogueira, D. E. Casarini, E. C. Vasquez, S. S. Meyrelles, "DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice," *International Journal of Hypertension*, vol. 2013, pp. 10, 2013.
10. M. L. Porto, B. P. Rodrigues, T. N. Menezes et al., "Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice," *Journal of biomedical science*, vol. 22:97, pp. 10, 2015.
11. G. Van den Berghe, "The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 14, pp. 407-420, 1991.
12. B. P. Rodrigues, B. P. Campagnaro, C. M. Balarini, T. M. C. Pereira, S. S. Meyrelles, E. C. Vasquez, "Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis," *Lipids in Health and Disease*, vol. 12, pp. 128, 2013.
13. F. Bonomini, L. F. Rodella, M. Moghadasian, C. Lonati, R. Rezzani, "Apolipoprotein e deficiency and a mouse model of accelerated liver aging," *Biogerontology*, vol. 14, pp. 209-220, 2013.
14. P. Kumar, R. K. Kale, N. Z. Baquer, "Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver," *Journal of aging research*, vol. 2011, pp. 8, 2011.
15. J. R. Mercer, E. Yua, N. Figg et al., "The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in  $ATM^{+/-}/ApoE^{-/-}$  mice," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, pp. 841-849, 2012.
16. A. Stachowicz, M. Suski, R. Olszanecki, J. Madej, K. Okoń, R. Korbut, "Proteomic analysis of liver mitochondria of apolipoprotein E knockout mice treated with metformin," *Journal of Proteomics*, vol. 77:21, pp. 167-175, 2012.
17. E. C. Vasquez, V. A. Peotta, S. S. Meyrelles, "Cardiovascular autonomic



- imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 29, pp. 635-646, 2012.
18. F. Bonomini, F. Filippini, T. Hayek et al., "Apolipoprotein E and its role in aging and survival," *Experimental Gerontology*, vol. 45:2, pp. 149-157, 2010.
  19. M. Liu, Y. Li, L. Han et al., "Adipose-derived stem cells were impaired in restricting CD4<sup>+</sup>T cell proliferation and polarization in type 2 diabetic ApoE<sup>-/-</sup> mouse," *Molecular Immunology*, vol. 87, pp. 152-160, 2017.
  20. Y. Liu, X. Xu, H. Dou, Y. Hua, J. Xu, X. Hui, "Apolipoprotein E knockout induced inflammatory responses related to microglia in neonatal mice brain via astrocytes," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 8, pp. 737–743, 2015.
  21. C. Lohmann, N. Schäfer, T. von Lukowicz et al., "Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periadventitial and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets," *Atherosclerosis*, vol. 207, pp. 360–367, 2009.
  22. C. M. Balarini, M. A. Leal, I. B. S. Gomes et al., "Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse," *Journal of Translational Medicine*, vol. 11:3, 2013.
  23. B. P. Campagnaro, A. L. Gava, S. S. Meyrelles, E. C. Vasquez, "Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse," *International Journal of Hypertension*, vol. 2012, pp. 9, 2012.
  24. S. P. Dalboni, B. P. Campagnaro, C. L. Tonini, E. C. Vasquez, S. S. Meyrelles, "The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice," *Open Journal of Blood Diseases*, vol. 2, pp. 51–55, 2012.
  25. Liu D, Xu Y. P53, Oxidative Stress, and Aging. *Antioxid. Redox Signal.* [Internet]. 2011;15:1669–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050134> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3151427>
  26. L. J. Yang, Y. Chen, J. He et al., "Effects of gambogic acid on the activation

of caspase-3 and downregulation of SIRT1 in RPMI-8226 multiple myeloma cells via the accumulation of ROS," *Oncology Letters*, vol. 3:5, pp. 1159–1165, 2012.

27. T. M. C. Pereira, B. V. Nogueira, L. C. F. Lima et al., "Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender," *Lipids in Health and Disease*, vol. 9:87, 2010.
28. M. L. Porto, L. C. F. Lima, T. M. C. Pereira et al., "Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice," *Lipids in Health and Disease*, vol. 10:155, 2011.
29. T. Pacana, M. Fuchs, "The Cardiovascular Link to Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Clinics in Liver Disease*, vol. 16, pp. 599–613, 2012.

**Artigo em desenvolvimento**

**Sildenafil reduces ROS-induced DNA damage of hematopoietic stem cells in apoe<sup>-/-</sup> mice.**

Bianca P. Rodrigues<sup>1</sup>, Marcella L. Porto<sup>1,3</sup>, Viviani P. Rosa<sup>1</sup>, Bianca P. Campagnaro<sup>4</sup>, Thiago M.C. Pereira<sup>3,4</sup>, Agata L. Gava<sup>1</sup>, Silvana S. Meyrelles<sup>1</sup> and Elisardo C. Vasquez<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES 29043-900, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Translational Physiology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, ES 29102-770, Brazil;

<sup>3</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology, Vila Velha, ES 29106-010, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES 29042-755 Brazil

\* Corresponding author

Elisardo Corral Vasquez

Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES 29043-900, Brazil;

e-mail: [evasquez@terra.com.br](mailto:evasquez@terra.com.br)